

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Anatomía Patológica



**COMPARACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN
PROTEÍCO ENTRE NEVUS Y MELANOMA.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Concepción Garrido Ruiz

Bajo la dirección de los doctores

José-Luis Rodríguez Peralto
Rosario Carrillo Gijón

Madrid, 2010

- ISBN: 978-84-693-3358-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Anatomía Patológica

TESIS DOCTORAL

**COMPARACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN
PROTEÍCO ENTRE NEVUS Y MELANOMA**



DIRIGIDA POR José-Luis Rodríguez Peralto y Rosario Carrillo Gijón

PRESENTADA POR María Concepción Garrido Ruiz

Madrid, 2009



D. José Luís Rodríguez Peralto, Profesor Titular del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad Complutense de Madrid y **Dña. Rosario Carrillo Gijón**, Médico adjunto del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

CERTIFICAN:

Que **Dña María C. Garrido Ruiz** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo “**COMPARACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN PROTEÍCO ENTRE NEVUS Y MELANOMA**” que a nuestro juicio reúne las condiciones para optar al Grado de Doctor.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid a diecinueve de Diciembre del año dos mil ocho.

Vº Bº Directores de la Tesis Doctoral

Dr. José L. Rodríguez Peralto

Profesor Titular

Departamento de Anatomía Patológica

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

Dra. Rosario Carrillo Gijón

Médico Adjunto

Servicio de Anatomía Patológica

Hospital Universitario Ramón y Cajal

Madrid

Este trabajo ha sido financiado gracias a las siguientes ayudas para la investigación:



AYUDAS PARA CONTRATOS DE FORMACIÓN EN INVESTIGACIÓN PARA PROFESIONALES CON FORMACIÓN SANITARIA ESPECIALIZADA.

Cofinanciación de un contrato del programa de Recursos Humanos de la Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación del Instituto de Salud Carlos III (Expte. Nº CM06/00094). Duración del contrato: 3 años (2007-2010)



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN “COMPARACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN PROTEICO ENTRE LESIONES MELÁNICAS BENIGNAS (NEVUS MELANOCÍTICO ADQUIRIDO Y NEVUS DE SPITZ), NEVUS DISPLÁSICO Y MELANOMAS. Estudio mediante tissue arrays (TMA)”.
FINANCIADO POR LA FUNDACIÓN MUTUA MADRILEÑA (MUTUA 2006-130). Investigador Principal: JOSÉ LUÍS RODRÍGUEZ PERALTO. Duración del proyecto tres años (2006-2008).

A mis padres,

A mis hermanas y a mi hermano

... la ansia por investigar es arrancarle secretos a la vida,... el descubrimiento científico, el encontrar algo que uno de momento se da cuenta que es el primero que lo ve y que es algo con una trascendencia... yo no conozco nada que produzca más emoción.

Severo Ochoa (1905-1993)

Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre.

Marie Curie (1867-1934)

Agradecimientos

A mis directores de tesis, por vuestro apoyo y ayuda durante estos años, más allá de lo profesional. Y, especialmente quiero agradecer al Profesor José-Luis Rodríguez Peralto, Medico adjunto del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre, porque “la gente se inspira más por un buen maestro que por un buen trabajo” (Rudolf Virchow) y, él ha sabido transmitirme con sus continuos consejos y sentido del humor, a parte de conocimientos, ilusión y motivación para la realización de esta tesis. Gracias por haber confiado en mí.

A todos los miembros del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre quiero agradecerles su continuo estímulo y apoyo en la realización de la presente tesis. Quería agradecer a todos los miembros del Staff del Servicio de Anatomía Patológica, por sus palabras de apoyo diarias y su confianza. Especialmente, a los miembros de la Sección de Dermatopatología, a Ana-Belén, por ser mi amiga, y estar ahí cada vez que la necesito, gracias por apoyarme en los malos momentos, y celebrarlo conmigo en los buenos. Gracias a Pilar, a Susana, y a Alicia por haberme apoyado cada día con vuestras sonrisas, y por haberme ayudado con los bloques, siempre en el último momento. También a los todos los residentes, por vuestra amistad, vuestro interés y compañía en las comidas, y por animarme cada vez que lo necesitaba. Gracias a Telma, porque tras nuestra etapa de 4 años de Residencia sé que siempre puedo contar contigo. Y, sobre todo, gracias a Rafa, porque tú más que nadie has sufrido esta tesis conmigo, y es tan tuya como mía. Gracias también a Lourdes y a Lidia, porque con su cariño y buen humor me animaban cada día.

Gracias a Soledad Alonso (ex-residente del Hospital 12 de Octubre), sin cuya ayuda y consejos no hubiera sido posible la realización de esta tesis. Gracias también a los miembros de la Unidad de Inmunohistoquímica del CNIO, Lydia Sánchez y Ana Díez por acogerme y ayudarme en la realización de la parte más importante de esta tesis. Y, a los miembros de la sección de Inmunohistoquímica del Hospital 12 de Octubre, al Dr. Claudio Ballestín por su apoyo y su constante interés por mi trabajo, y a Rosa y a Ángela, por prestarme su ayuda siempre que lo he necesitado.

Y, especialmente quería agradecer a Beatriz Pérez-Gómez, Jefa de Sección e Epidemiología Ambiental del Centro Nacional de Epidemiología (CNE), su ayuda y dedicación durante el último año, sin las que no hubiera sido podido realizar esta tesis.

Finalmente, a mi familia, por ser el mejor apoyo que se puede tener durante toda la vida. A mi madre por ser un modelo a seguir y un estímulo constante de superación. A mi padre, por su cariño, su sentido del humor y su confianza plena en mí. A mis hermanas, Carmen y Guadalupe, porque aunque en tan poco espacio no puedo decir todo lo que me gustaría, gracias por estar siempre ahí. Gracias Upe, porque aunque nos separa la distancia, seguimos estando juntas. Gracias Carmen, por los años de convivencia en Madrid, y haberme sufrido en los peores y en los mejores momentos. Y, gracias Juan-Ma, por tu sentido común, tu buen humor y tu cariño.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

ÍNDICE

Índice	xiii
Índice de Figuras	xx
Índice de Tablas	xxi
Abreviaturas	xxiii
Resumen	xxvii

I. Introducción	1
1. La piel. Los melanocitos	3
2. Lesiones melanocíticas benignas	4
2.1. Nevus melanocíticos congénitos	4
2.1.1. Características clínicas e histopatológicas	5
2.1.2. Diagnóstico del nevus melanocítico congénito	5
2.2. Nevus melanocíticos adquiridos	6
2.2.1. Características clínicas	6
2.2.2. Diagnóstico de los nevus adquiridos	7
2.2.3. Variantes peculiares de nevus adquiridos	7
2.3. Nevus displásicos	10
2.3.1. Controversias en relación con el nevus displásico	10
2.3.2. Características clínicas e histopatológicas	11
2.3.3. Importancia del diagnóstico: nevus displásico y melanoma	13
2.3.4. Tratamiento y prevención	13
2.4. Nevus de Spitz	14
2.4.1. Características clínicas e histopatológicas	14
2.4.2. Recuerdo histórico	14
2.4.3. Diagnóstico diferencial	15
3. Melanoma	16
3.1. Embriología	17
3.2. Epidemiología	17
3.3. Etiología	18
3.3.1. Radiación solar	19
3.3.2. Factores químicos	19
3.3.3. Factores hormonales	20
3.3.4. Factores genéticos	20
3.4. Patogenia	21
3.5. Clínica	21
3.6. Anatomía Patológica	22
3.7. Pronóstico y estadificación	25
3.8. Evolución y tratamiento	28

4. Carcinogénesis en el melanoma	29
4.1. Carcinogénesis vs. enfermedad del ciclo celular	29
4.2. Modelo de progresión tumoral en el melanoma	29
5. Perfil genético-molecular de las lesiones melanocíticas	32
5.1. Genes de susceptibilidad en el melanoma	33
5.1.1. Gen CDKN2a	33
5.1.2. Gen CDK4	35
5.1.3. Gen localizado en el locus 1p22	36
5.1.4. Gen MCR1	36
5.2. Mutaciones somáticas en el melanoma	36
5.2.1. Cascada de la proteínas quinasas MAPK	37
5.2.2. Receptor HGF	38
5.2.3. Gen supresor PTEN	39
5.2.4. Gen MITF	40
5.3. Moléculas de adhesión	41
5.3.1. Cadherinas	42
5.3.2. Integrinas	43
5.3.3. Osteonectina	44
5.3.4. Osteopontina	44
5.4. Heterogeneidad genómica del melanoma	44
6. Marcadores moleculares en el melanoma	48
6.1. Marcadores de diferenciación melanocítica	48
6.2. Marcadores de progresión del melanoma	49
6.2.1. Factores de crecimiento y receptores de los factores de crecimiento	49
6.2.2. Moléculas de señalización/factores de transcripción	50
6.2.3. Marcadores de proliferación	51
6.2.4. Moléculas de adhesión	52
6.2.5. Proteasas	52
6.2.6. Otras proteínas	53
 II. Justificación, Hipótesis y Objetivos	 57
1. Justificación	59
1.1. Nevus melanocíticos: marcadores de riesgo de melanoma	59
1.2. Simuladores del melanoma	60
1.3. Precursores del melanoma	60
2. Hipótesis	61
3. Objetivos	61
 III. Material y Métodos	 63
1. Muestras tisulares: selección de casos y controles	65

1.1. Selección de casos	65
1.2. Selección de los controles	65
2. Variables a estudio: clínicas, histopatológicas y biológicas	66
2.1. Variables clínicas	66
2.2. Variables anatomopatológicas	67
2.3. Variables moleculares	67
3. Realización de las matrices tisulares o <i>tissue microarrays</i>	68
3.1. Selección del material	69
3.2. Diseño del “tissue microarray”	69
3.3. Selección del bloque donante	69
3.4. Rehacer los bloques donantes	70
3.5. Selección de la zona a pinchar en el bloque donante	70
3.6. Preparación del bloque receptor	71
3.7. Construcción del “array”	71
3.8. Corte de los tissue microarrays	73
3.9. Almacenamiento de los cortes	74
3.10. Tinciones de inmunohistoquímica	74
4. Valoración de las muestras	78
5. Almacenamiento de datos	80
6. Estudio estadístico	80
6.1. Estudio descriptivo	80
6.2. Estudio analítico	80
 IV. Resultados	 83
1. Características clínicas de las lesiones melanocíticas	85
1.1. Edad	85
1.2. Sexo	85
1.3. Localización de las lesiones melanocíticas	87
1.4. Dimensión de las lesiones melanocíticas	87
1.5. Tipos histológicos de melanomas	87
1.6. Características pronósticas de los melanomas	88
1.6.1. Fase de crecimiento de los melanomas	88
1.6.2. Espesor de Breslow	89
1.6.3. Nivel de Clark	89
1.6.4. Ulceración	90
1.6.5. Metástasis	90
1.7. Estatus del paciente en casos de melanoma	91
1.8. Otras variables clínicas de los melanomas	91
1.8.1. Fototipo	91
1.8.2. Profesión	91

1.8.3. Antecedentes familiares	91
2. Características histológicas de las lesiones melanocíticas	92
2.1. Nevus melanocíticos congénitos	92
2.2. Nevus melanocíticos adquiridos	92
2.3. Nevus displásicos	94
2.4. Nevus de Spitz	95
2.5. Melanomas en fase de crecimiento radial	96
2.6. Melanomas en fase de crecimiento vertical	97
3. Características inmunohistoquímicas de las lesiones melanocíticas: análisis descriptivo y comparativo	98
3.1. Características inmunohistoquímicas de los nevus congénitos y de los nevus adquiridos	99
3.2. Características inmunohistoquímicas de los nevus displásicos	100
3.3. Características inmunohistoquímicas de los nevus de Spitz	102
3.3.1. Características inmunohistoquímicas de los nevus de Spitz y comparación con nevus adquiridos intradérmicos/compuestos y displásicos	102
3.3.2. Expresión de marcadores proteicos en nevus de Spitz vs. Melanomas	104
3.4. Comparación de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos en nevus comunes y displásicos con melanomas en fase de crecimiento radial y en fase de crecimiento vertical	107
V. Discusión	117
1. Marcadores de diferenciación melanocítica	119
2. Receptores de membrana	121
2.1. Caveolina	121
2.2. c-kit	123
3. Proteínas de control del ciclo celular	125
3.1. Ciclina D1	127
3.2. Quinasa dependiente de ciclina CDK4	129
3.3. Inhibidores de CDK (CKI)	130
3.3.1. CKI p16 ^{INK4}	130
3.3.2. CKI p21 ^{CIP1/WAF1}	132
3.4. p53, el guardián del genoma	134
3.5. Proteína del Retinoblastoma	136
4. Proteína inhibidora de la apoptosis: Survivina	138
5. Marcador de proliferación Ki-67	140
6. SISTEMA MMR ("MISMATCH REPAIR")	141
7. Proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima	145

7.1. Cadherinas	145
7.2. SPARC (osteonectina/BM-40)	148
7.3. Osteopontina	151
7.4. PKC α (<i>protein kinase Ca</i>)	153
7.5. WT1	157
8. Otras proteínas	159
8.1. HLA	159
8.2. Topoisomerasa II α	161
 VI. Conclusiones	 165
 Bibliografía	 169

Índice de figuras

Fig I.1. Estructura de la piel	3
Fig I.2. Localización de los melanocitos en la epidermis	4
Fig I.3. Nevus de localizaciones especiales	9
Fig I.4. Nevus displásicos con atipia arquitectural y citológica moderada	12
Fig I.5. Imagen histológica del melanoma de extensión superficial	23
Fig I.6. Imagen histológica del melanoma nodular	24
Fig I.7. Imagen histológica: melanoma lentiginoso acral	24
Fig I.8. Imagen histológica: lentigo maligno melanoma	25
Fig I.9. Modelo de progresión tumoral de Clark (H&E)	31
Fig I.10. Modelo de la progresión molecular y biológica en el melanoma	32
Fig I.11. Locus 9p21	35
Fig I.12. Activación de la vía de señalización MAPK	38
Fig I.13. Vías de señalización MAPK y PI3K	39
Fig I.14. Regulación de MITF	41
Fig I.15. Vía de señalización mediada por catenina- β	43
Fig I.16. Localización cromosómica de los cambios en el número de copias de la secuencias de ADN en 32 casos de melanomas primarios	45
Fig I. 17: Alteraciones genómicas en lesiones melanocíticas benignas y malignas	46
Fig I.18. Alteraciones genómicas frecuentes y regiones génicas diferencialmente afectadas en cada grupo de melanomas.	47
Fig I.19. Resumen de las alteraciones genéticas en melanomas con una exposición solar variable	48
Fig I. 20. Progresión del melanoma	53
Fig I. 21. Expresión proteica en la progresión del melanoma	55
Fig III.1. Esquema de la construcción de un TMA	69
Fig III.2. Cristal y bloque de parafina marcados en el área seleccionada	70
Fig III.3. Material necesario para la realización de las matrices tisulares	71
Fig III.4. Proceso de la construcción del "array"	72
Fig III.5. Imagen de la muestra donante tras el proceso	73
Fig III.6. Resultado final tras la construcción de un TMA	73
Fig III.7. Preparación histológica parafinada, y desparafinada	74
Fig III.8. Ejemplo de una preparación histológica de un TMAs teñido (H&E)	74
Fig III.9. Esquema básico de la tinción de inmunohistoquímica	78
Fig IV.1. Variable "sexo" en las lesiones melanocíticas	85
Fig IV.2. Variable "sexo" según el tipo de lesiones melanocíticas: benignas/malignas	86
Fig IV.3. Variable "sexo" según el tipo de nevus	86
Fig IV.4. Variable "localización" según el tipo de lesiones melanocíticas	87
Fig IV.5. Variable "tipos histológicos" de melanomas	88
Fig IV.6. Porcentaje de melanomas estudiados en fase de crecimiento radial y vertical	88

Fig IV.7. % de melanomas según el Espesor de Breslow y la fase de crecimiento	89
Fig IV.8. Niveles de Clark en nuestra serie de melanomas	90
Fig IV. 9. Dos cilindros de nevus congénitos	92
Fig IV.10. Dos cilindros de nevus adquiridos comunes	93
Fig IV.11. Dos cilindros correspondientes de nevus displásicos	94
Fig IV.12. Tres cilindros de nevus de Spitz de nuestra serie	95
Fig IV.13. Dos cilindros de melanomas en fase de crecimiento radial	96
Fig IV.14. Dos cilindros de melanomas en fase de crecimiento vertical	97
Fig IV. 15. Expresión de varios marcadores en varios cilindros tisulares	110
Fig V.1. Ciclo celular y la actividad reguladora de múltiples complejos CDK-ciclina	126

Índice de tablas

Tabla I.1. Comparación de las características de melanoma	13
Tabla I.2. Clasificación TNM del Melanoma	27
Tabla I.3. Definición de los grupos de estadiaje del melanoma cutáneo	27
Tabla I. 4. Clasificación de los marcadores de las lesiones melanocíticas	54
Tabla II.1. Riesgo relativo de melanoma en pacientes con nevus comunes/displásicos	59
Tabla III.1. Selección de casos y controles incluidos en nuestro estudio	66
Tabla III.2. Marcadores moleculares utilizados en el estudio	68
Tabla III.3. Anticuerpos, clones, casa comerciales, diluciones y protocolos de desenmascaramiento utilizados con los 23 marcadores.	76
Tabla III.4. Ac. estudiados (visualización, reactividad, punto de corte, y controles)	79
Tabla IV.1. Variable “edad” en las lesiones melanocíticas	85
Tabla IV.2. Variable “ulceración” en la serie de melanomas	90
Tabla IV.3. Variable “metástasis” en la serie de melanomas	90
Tabla IV.4. Variable “metástasis” en función de la fase de crecimiento	91
Tabla IV.5. Variable “estatus” en la serie de melanomas	91
Tabla IV.6. Cilindros interpretables en la serie de 187 lesiones melanocíticas	98
Tabla IV.7. Características IHQ de los nevus congénitos vs. nevus comunes	99
Tabla IV.8. Características IHQ de los nevus displásicos vs. nevus comunes	101
Tabla IV.9. Características IHQ de los nevus de Spitz vs. nevus adquiridos	103
Tabla IV.10. Características IHQ de los nevus de Spitz vs. melanomas	105
Tabla IV.11. Características IHQ de melanomas vs. nevus adquiridos	108

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ACS	Sociedad Americana del Cancer	MN	melanoma nodular
ACTH	hormona adrenocorticotropa	MSA	antígeno melanosoma
ADAM9	ADAM metaloproteinasa dominio 9	MSH	hormona estimulante del melanocito
ADN	ácido desoxirribonucleico	MSI	inestabilidad de microsatélites
AJCC	Comité Conjunto Americano del Cáncer	MSS	estabilidad de los microsatélites
ANC	alteraciones en el número de copias	NAA	nevus con alteración arquitectural y atipia citológica
APC	Gen de la poliposis adenomatosa de colon	NF-κB	factor nuclear kappa B
ARN	ácido ribonucleico	NMC	nevus melanocítico congénito
ATP	adenosin trifosfato		
CCHSP	Carcinoma Colorrectal Hereditario sin Poliposis	NMCG	nevus melanocítico congénito gigante
CCND1	Gen de la ciclina D1	NNA	nevus melanocítico adquirido
CDK	quinasas dependientes de ciclinas	ONS	óxido nítrico sintasa
CDKN2A	inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina 2A	OPN	Osteopontina
CKI	inhibidor de CDK	PCB	bifenilos policlorados
CSD	dominio de andamiaje de la caveolina	PCNA	antígeno nuclear de proliferación celular
CSF	factor estimulante de colonias	PDGFR	factor de crecimiento derivado de las plaquetas
EGFR	factor de crecimiento epidérmico	PEComas	neoplasias de las células epitelioides perivasculares
KIP/CIP	proteínas inhibidoras de las quinasas	PIP3	fosfatidil-inositol fosfato 3
FAMMM	melanoma familiar atípico con molas múltiples	PKC	proteína quinasa C
FISH	Hibridación in situ por inmunofluorescencia	ARF	proteína del cuadro de lectura alternativo
GF	factor de crecimiento	PVC	cloruro de polivinilo
GIST	tumor del estroma gastro-intestinal	RB	Retinoblastoma
HGF	factor de crecimiento hepatocitario	RHC	fenotipo pelirrojo
HLA/CMH	complejo de antígenos leucocíticos humanos/ complejo mayor de histocompatibilidad	RTK	receptores tirosín-quinasas
IAP	proteínas inhibidoras de la apoptosis	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
INK4a	inhibidor de la quinasa 4 a	SCF	factor de la célula <i>ítem</i>

LMM	lentigo maligno melanoma	SDI1	inhibidor derivado de la senescencia
MAPK	proteínas quinasas activadas por mitógenos	SIBLING	glicoproteínas vinculadas a la unión entre los ligandos-N y la integrina
MART-1	antígeno del melanoma reconocido por células T	SNC	sistema nervioso central
MCR	receptor de melanocortina	SPARC:	proteína ácida secretada y rica en cisteína
MDA-6	asociado a la diferenciación del melanoma-6	TCF	factor complejo ternario
MEC	matriz extra-celular	TEM	transición epitelio-mesénquima
MEL-CAM	molécula de adhesión celular del melanoma	TMA	matriz tisular
MES	melanoma de extensión superficial	TPA	12-o-tetradecanoilforbil-13-acetato
MITF	factor de transcripción asociado a microftalmia	TP53	proteína tumoral 53
MLA	melanoma lentiginoso acral	UV	radiación ultravioleta
MMP2	metalo-proteinasa de la matriz 2	WAF	factor activado por p53 de tipo "natural"
MMR genes	genes de reparación de errores de apareamiento replicativos	WNT	vía de señalización Wingless
		WT	Tumor Wilms

RESUMEN

Resumen

El nevus melanocítico es una proliferación anormal pero benigna de los melanocitos de la piel que tienden a agruparse en nidos o tecas. Su importancia radica en su posible relación con el melanoma como simulador, marcador de riesgo o posible precursor. De entre todos, los nevus displásicos y los congénitos, especialmente los gigantes, son los de mayor potencial maligno. Los nevus displásicos y los de Spitz son los que más comúnmente se confunden con melanomas.

El melanoma es el cáncer de piel más frecuente, representa más del 50%, supone el 3-4% de las neoplasias cutáneas, y sin embargo, es el responsable de la gran mayoría de las muertes debidas a cánceres de piel (hasta el 65%), y en un contexto más general, se le atribuyen el 1% de las muertes por cáncer de cualquier etiología. La incidencia de esta neoplasia ha ido creciendo de manera exponencial en la población mundial. La peculiar forma de progresión tumoral del melanoma dicotomiza su historia natural en dos fases: fase de crecimiento radial, en la que el potencial metastático es prácticamente nulo, y fase de crecimiento vertical en la que el tumor adquiere la capacidad de metastatizar. En la estadificación microscópica del tumor los hallazgos de mayor importancia pronóstica son el espesor tumoral y la ulceración.

Por otra parte, recientemente, la heterogeneidad en la genómica del melanoma se ha convertido en una importante área de investigación puesto que se asume que en ella están las claves de la patogenia de la enfermedad, de su comportamiento biológico, y de su posible escasa respuesta al tratamiento.

Objetivos

Aunque en la mayoría de los casos la distinción microscópica entre nevus y melanomas, es fácil, en contadas ocasiones se plantean diagnósticos diferenciales entre ambas entidades, no existiendo parámetros objetivos para distinguirlos. Nuestro estudio pretende comparar la expresión de diferentes proteínas entre lesiones melanocíticas benignas y malignas, con dos objetivos concretos: a) establecer el papel de dichas moléculas en la transformación maligna de los melanocitos y b) Sugerir un panel de proteínas útil en el diagnóstico diferencial entre nevus y melanoma.

Material y Métodos

Nuestro estudio reúne un total de 187 lesiones melanocíticas primarias (108 nevus y 79 melanomas), que proceden del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, entre los años 1995 y 2005.

Se construyen matrices tisulares con 37 nevus intradérmicos, 6 nevus compuestos, 11 nevus congénitos, 28 nevus de Spitz y 26 nevus displásicos, 17 melanomas radiales, y 62 melanomas verticales, también se incluyen 24 muestras de diferentes tejidos normales. Se cortan, y se tiñen con hematoxilina y eosina y con anticuerpos para identificar el producto

proteico de una selección de genes estadísticamente y biológicamente significativos. Se analizan al menos dos cilindros de tejido de 1,5 mm de diámetro de cada uno de los casos y dos cilindros de cada uno de los controles, con criterios claros y contrastados en la literatura para los puntos de corte y métodos de valoración sencillos. Este estudio transversal utiliza el Test Exacto de Fisher para valorar las diferencias de expresión en los distintos marcadores moleculares entre dos grupos de lesiones.

Resultados y Discusión

Los marcadores inmunohistoquímicos más ampliamente utilizados en la clínica diaria para apoyar el diagnóstico de melanoma son la proteína S-100, que en nuestra serie ha demostrado un 100% de inmunopositividad en todas las lesiones melanocíticas benignas y malignas, Melan-A (MART-1), 93% en melanomas, 96% en nevus de Spitz y 100% en melanomas y HMB-45.

En relación con los receptores de membrana, se observa una disminución significativa de la expresión de caveolina entre nevus y melanomas, lo que podría ser considerado un marcador de progresión tumoral. C-kit muestra intensa positividad en nevus displásicos, en el compartimento intraepidérmico de los nevus adquiridos y en melanomas en fase de crecimiento radial (hasta el 88%), que disminuye considerablemente en melanomas verticales (27%), lo que coincide con los estudios más recientes con pérdida progresiva de su expresión en el componente dérmico. Los casos de melanomas con niveles altos de proteína c-kit, suelen estar relacionados con mutaciones o amplificaciones, lo que puede tener implicaciones terapéuticas.

La progresión del ciclo celular está controlada por una serie de proteínas implicadas en la carcinogénesis. La ciclina D1 muestra escasa positividad en nevus comunes y alta en nevus displásicos, en melanomas radiales y en nevus de Spitz, con disminución en melanomas verticales, lo que sugiere que podría tener un papel en el desarrollo inicial de estas lesiones. La proteína p16, inhibidor del complejo ciclina D/CDK4, está expresada en nevus congénitos, intradérmicos, displásicos y de Spitz (entre 98% y 100%) y disminuye en melanomas (89%). En relación con la proteína p21, inhibidor del complejo ciclina-CDK de la familia CIP1, los nevus de Spitz han mostrado altos niveles de p21, lo que nos hace pensar en su peso específico relativo con respecto a la senescencia. La expresión de p53, gen supresor, que revela negatividad en nevus congénitos, moderada positividad en nevus intradérmicos (17%) y displásicos (30%) y sobreexpresión en melanomas (79-82%) no siempre refleja la presencia de mutaciones genéticas de TP53, por lo que otros mecanismos moleculares u otros componentes de la vía de p53 podrían estar implicados en la sobreexpresión de dicha proteína. Por otra parte, el gen supresor RB que muestra mayor inmunopositividad en melanomas (75%) que en nevus (5% en nevus intradérmicos; 20% en nevus displásicos en nuestro estudio), parece mostrar mayor intensidad de fosforilación de pRb en melanomas, mientras que las lesiones benignas muestran escasa-moderada expresión de pRb y de p-RB fosforilada, que se expresa de forma homogénea en toda la lesión, según estudios de la literatura.

La expresión nuclear de la survivina, proteína clave para la regulación de la apoptosis,

muestra una diferencia significativa entre lesiones melanocíticas benignas (0%) y el melanoma (29% y 68% en melanomas radiales y verticales respectivamente), lo que sugiere su implicación en fases tardías de la evolución del melanoma.

El antígeno Ki-67, índice de proliferación, puede ser un valioso vaticinador de la progresión de las lesiones melanocíticas, y un factor pronóstico significativo, aunque no independiente (0% en nevus y hasta 37% en melanomas en fase crecimiento vertical).

Por otra parte, aunque muchos estudios sugieren la implicación de la alteración de los microsátélites en la carcinogénesis del melanoma, la expresión MMR está preservada y no se observa una diferencia significativa en los valores de expresión de MMR entre los melanomas MSI y MSS, lo que sugiere que la mayoría de estos tumores mantienen genes MMR funcionales.

En relación con las proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima, las cadherinas, mediadoras de la adhesión célula-célula, muestran una disminución de la expresión de cadherina E en el componente profundo, e inmunopositividad heterogénea para cadherina-N en melanomas en fase de crecimiento vertical que parece inducir la motilidad, la invasión, la capacidad metastásica, y un peor pronóstico. SPARC/osteonectina parece favorecer la progresión y empobrecer el pronóstico en las lesiones melanocíticas por su papel en el ciclo celular, la angiogénesis y la TEM. La Osteopontina muestra una tinción débil en nevus comunes (14%), nevus displásicos (13%), y melanomas in situ y alta en melanomas primarios invasivos (71%), lo que sugiere, su relevancia en la progresión y en el pronóstico del melanoma. La PKC α , forma parte de la maquinaria de señalización de la célula y no parece jugar un papel directo en la transformación maligna de los melanocitos, sin embargo se asocia con un incremento en el potencial invasivo y metastático de las células del melanoma. Además, esta proteína podría representar una diana terapéutica, ya que actúa sobre una vía específica. Finalmente, WT1 parece estar implicado en la TEM en el melanoma, funcionando también como marcador de la progresión tumoral en fases tardías, y como marcador de pronóstico.

En última instancia, la ADN-topoisomerasa II α , enzima celular especializada que estabiliza la tensión helicoidal de la doble hebra de ADN, podría ser considerada un marcador molecular capaz de diferenciar entre melanoma primario (76% y 79% en melanomas en fase de crecimiento radial y vertical respectivamente) y lesiones melanocíticas benignas como el nevus de Spitz (15%) o nevus displásico (17%), aunque tampoco serviría como marcador definitivo.

Conclusiones

Muchos de los marcadores estudiados validan la teoría de la progresión biológica hacia la malignidad de las lesiones melanocíticas: nevus comunes-nevus displásicos- melanomas en fase de crecimiento radial-melanomas en fase de crecimiento vertical. Además, estas proteínas (receptores de membrana, ciclina D1, p21, p53, Rb, topoisomerasa) caracterizan al nevus displásico como una fase intermedia-inicial en la progresión tumoral.

Aunque ninguno de estos marcadores resulta por sí sólo de utilidad en el diagnóstico o en el tratamiento del melanoma, por la heterogeneidad génica entre los diferentes subtipos y

por la proliferación heterogénea de diferentes clones dentro de un mismo tumor, la utilización de un panel de marcadores previamente seleccionados podría ser de ayuda en el diagnóstico diferencial de los mismos. Así, en casos de difícil diagnóstico diferencial entre nevus de Spitz y melanomas en fase de crecimiento vertical, la ciclina D1, p21, survivina, topoisomerasa II α , Ki-67, HMB-45, caveolina, SPARC y PKC α son proteínas diferencialmente expresadas ($p \sim 0.000$). Un estudio de Regresión logística con estas proteínas probablemente facilite el diagnóstico diferencial entre nevus de Spitz y melanoma.

Con nuestro estudio conseguimos también poner de relieve la importancia de algunos grupos de proteínas como las moléculas implicadas en la transición epitelio-mesénquima (cadherinas, osteonectina, osteopontina, PKC α , y WT1), sobreexpresadas en las lesiones melanocíticas profundas, que favorecen la invasión de la dermis tanto en nevus benignos como en melanomas. No representan el elemento definitivo en la transformación maligna.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. La piel. Los melanocitos

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano, ocupa aproximadamente 2 m², y su espesor varía entre los 0,5 mm en los párpados a los 4 mm en el talón. Su peso aproximado es de 5 kg. Actúa como barrera protectora que aísla al organismo del medio que le rodea, protegiéndolo y contribuyendo a mantener íntegras sus estructuras, al tiempo que actúa como sistema de comunicación con el entorno.

Se estructura en 3 estratos (**Figura I.1**):

- Epidermis.
- Dermis.
- Tejido Subcutáneo

Cada una de las capas tiene funciones y componentes diferentes que se interrelacionan.

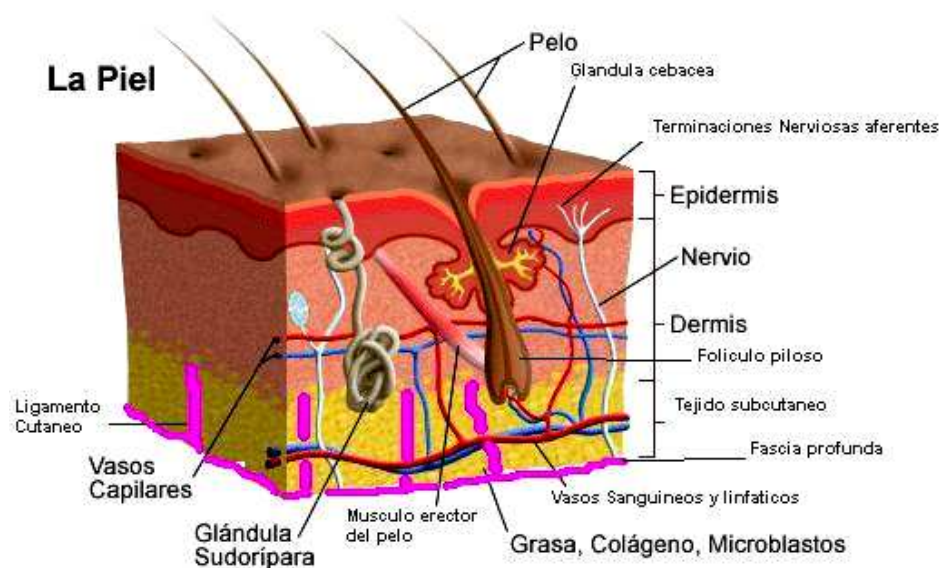


Fig I.1. Estructura de la piel

La epidermis se compone en su mayoría por queratinocitos, además de los melanocitos encargados de la pigmentación de la piel y que se encuentran justamente sobre el estrato germinativo.

Los melanocitos (**Figura I.2**) son células dendríticas provistas de melanosomas y

especializadas en la biosíntesis y transporte de melanina, pigmento que da color a la piel y al pelo, así como a la úvea ocular. Derivan de la cresta neural y migran hacia la epidermis y el folículo piloso durante la embriogénesis.

Los melanocitos se caracterizan por su núcleo ovoide y en condiciones normales se disponen en la capa basal epidérmica contactando con los queratinocitos por medio de sus dendritas. La densidad de melanocitos es variable dependiendo de la región anatómica, pero es muy constante entre los individuos de diferentes razas. El color de la piel depende de la actividad de estas células. La melanina puede ser de eumelanina (color marrón) o feomelanina (pigmento rojo amarillento). Ambas formas son producidas a partir de la tirosina, en el Retículo Endoplásmico Rugoso y el Aparato de Golgi, mediante la hormona estimulante del melanocito (MSH) que se fija al receptor de la membrana de éstos (MCR).

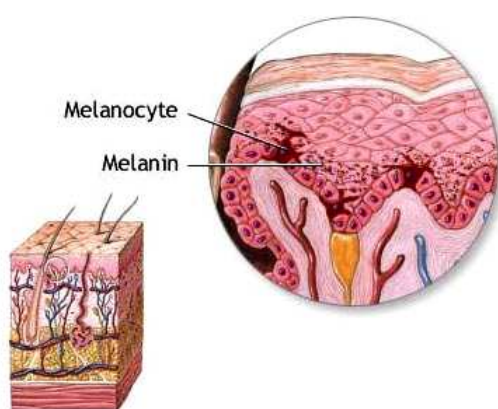


Fig I.2. Localización de los melanocitos en la epidermis

2. Lesiones melanocíticas benignas

El nevus melanocítico es una proliferación anormal pero benigna de los melanocitos de la piel que tienden a agruparse en nidos o tecas. Aunque pueden estar presentes en un 1% de los neonatos, suelen iniciar su aparición a partir de los 6-12 meses e ir aumentando en número y tamaño hasta alrededor de los 25 años. Es esencial diferenciar en la anamnesis los nevus presentes desde el nacimiento o en los primeros meses de la vida (nevus melanocíticos congénitos (NMC)), de los que aparecen durante la vida del individuo (nevus melanocíticos adquiridos) (1).

2.1. Nevus melanocíticos congénitos

Los nevus congénitos son acumulaciones de melanocitos névicos benignos que suelen proliferar tanto en la epidermis, como en la dermis papilar y reticular, y que, por definición,

están presentes en el momento del nacimiento o aparecen durante el primer año de vida (1). Se dan en aproximadamente el 1% de los recién nacidos (2,3). Crecen con el individuo (sobre todo en los primeros 6 meses de edad y muy lentamente posteriormente) (4), y en el adulto suelen medir más de 1 cm de diámetro.

2.1.1. Características clínicas e histopatológicas

Desde el punto de vista clínico, estas lesiones presentan márgenes más o menos definidos, pueden ser planas o papulosas, y pueden contener pelo. La pigmentación de los NMC puede ser homogénea o mostrar varias tonalidades de marrón y negro en un mismo nevus, y son asintomáticas. La distinción clínica no es posible en el caso de lesiones de pequeño tamaño, mientras que cuando su diámetro supera los 1.5 cm, los nevus suelen ser considerados congénitos (5).

Desde una perspectiva microscópica, se han descrito una serie de criterios que, aunque pueden considerarse válidos para la mayoría de los nevus, carecen de la especificidad y sensibilidad necesarias para emplearse como único elemento de juicio. Estas características microscópicas son: la presencia de melanocitos profundos localizados de forma difusa por todo el espesor de la dermis reticular, la localización de los mismos alrededor de los anejos (vasos sanguíneos, nervios, glándulas sudoríparas y folículos pilosos) y el hecho de que, con frecuencia, éstos disecan las fibras de colágeno de la dermis (1).

2.1.2. Diagnóstico del nevus melanocítico congénito (NMC)

Las estrategias dirigidas a diferenciar los nevus melanocíticos adquiridos (NMA) de los NMC carecerían de sentido si no fuese por el mayor potencial de transformación a melanoma que se atribuye a los NMC (6,7). El riesgo de malignización es directamente proporcional a su tamaño (6,7). Por dicho motivo, la clasificación de los NMC toma como punto de referencia su tamaño. Se consideran NMC de pequeño tamaño a aquellos de menos de 1.5 cm de diámetro, nevus melanocíticos congénitos gigantes (NMCG) a los mayores de 20 cm y NMC medianos o intermedios al resto, es decir, a los que miden entre 1.5 cm y 20 cm (8,9). Aunque el riesgo de malignización se ha situado entre 2% y 38%, lo más realista sería situarlo en 5% o menos (10).

La incidencia global de los NMC se calcula alrededor del 1%, siendo la mayor parte de ellos de pequeño tamaño. En el momento de nacer y durante los primeros meses de vida, los NMC son generalmente máculas de color marrón claro. Con el tiempo, especialmente en la pubertad, su superficie se eleva y puede mostrar un aspecto abollonado. Los NMCG presentan, además de su tamaño, algunas características clínicas que facilitan su diagnóstico, como son: la presencia casi constante de pelos terminales en su superficie, los distintos tonos de marrón y negro en su coloración y su distribución, por orden decreciente, en el tronco, las extremidades y la cabeza, adoptando en ocasiones una morfología curiosa («en bañador», «en capelina», etc) (5). Además, presentan con frecuencia nevus melanocíticos «satélites» en su vecindad, y no es raro observar el desarrollo de nódulos proliferativos, de entre pocos milímetros a varios centímetros, en su superficie. El crecimiento lento y la falta de ulceración de estos nódulos,

orienta hacia la benignidad del proceso (11). Sin embargo, el desarrollo de un melanoma sobre el nevus puede iniciarse de forma similar, de modo que se recomienda llevar a cabo el estudio histológico de estas proliferaciones en todos los casos.

En cuanto a la relación entre el tamaño del nevus y el riesgo de melanoma, se ha demostrado que existe un riesgo de mortalidad por melanoma mil veces mayor en nevus de más de 20 cm o que ocupan más del 5% de la superficie corporal (12). En relación con la edad, el 80% de los melanomas que aparecen en pacientes con NMCG lo hacen antes de los 7 años, y el 50% antes de los 2 años (12). El tratamiento del NMCG debe realizarse de forma precoz, dado su potencial riesgo de malignización (12,13). Además, los nevus gigantes del área de la cabeza y cuello pueden asociarse a afectación neurológica por infiltración leptomeníngea y de otras estructuras del sistema nervioso central, con aparición de hidrocefalia, retraso mental y melanomas en esta localización (melanosis neurocutánea). En los que afectan la zona dorsal media puede existir espina bífida y otras anomalías vertebrales y medulares. Los NMCG de las extremidades pueden asociarse a malformaciones óseas (12-14).

Por otra parte, los melanomas primarios congénitos, con o sin nevus congénito asociado, son muy raros.

2.2. Nevus melanocíticos adquiridos

Los nevus melanocíticos adquiridos junturales, compuestos e intradérmicos representan estadios evolutivos distintos de un mismo proceso, cuya historia natural clínica se corresponde con su evolución histopatológica (1). En la edad infantil se inicia una proliferación de melanocitos en la unión dermo-epidérmica, por lo que la mayoría de NM presentes en estas edades es de tipo juntural. Con el paso del tiempo, los nidos de melanocitos migran hacia la dermis papilar, dando lugar a los nevus melanocíticos compuestos. Posteriormente el componente juntural disminuye y sólo quedan los melanocitos dérmicos, dando lugar al NM intradérmico. Aunque esta teoría es la más aceptada ha sido también muy discutida (15,16,17). El estadio final de un NM es un apéndice cutáneo del color de la piel normal en el que se aprecian muy pocas células névicas, escaso pigmento y abundantes adipocitos.

2.2.1. Características clínicas

Son las tumoraciones más frecuentes en el hombre, la mayoría aparecen entre los 5 y los 30- 35 años de la vida, momento alrededor del cuál alcanzan su máximo número. A partir de la cuarta década de la vida su número tiende a disminuir y son menores en los individuos muy ancianos (5).

Desde el punto de vista clínico, los nevus junturales son pequeños (1 mm a 1 cm), redondos o elípticos y planos o mínimamente elevados. Su color puede variar desde marrón claro al negro (5). Los nevus compuestos son pápulas redondas de color marrón menos intenso (5). Los nevus intradérmicos son pápulas hemisféricas de superficie lisa o papilomatosa, de tacto duro, a veces blando, pero elástico y poco o nada pigmentados. Además, por su aspecto

y las características de su superficie se han denominado verrucosos, cerebriiformes, polipoides, en mora, etc (5).

Los NM pueden localizarse en cualquier zona de la piel, incluso en la unión cutáneo-mucosa, en la cavidad oral, la laringe, las uñas, la conjuntiva ocular, los genitales externos y las zonas acras, incluyendo las palmas y las plantas.

2.2.2. Diagnóstico de los nevus adquiridos

El diagnóstico de los NM puede hacerse clínicamente la mayoría de las veces; sin embargo, cuando existen dudas al respecto debe recurrirse a la biopsia.

2.2.3. Variantes peculiares de nevus adquiridos

En las últimas tres décadas se han descrito muchas variedades de nevus melanocíticos adquiridos comunes susceptibles de ser confundidos clínica, dermatoscópica o histológicamente con melanoma.

1. Nevus de localizaciones especiales: Incluyen un grupo de lesiones que por su localización y apariencia histológica pueden simular tanto a nevus displásicos como a melanomas (18). Sin embargo, no se relacionan con un riesgo aumentado para el desarrollo de melanomas (18). Por otra parte, hay que tener en cuenta que en estas localizaciones también pueden darse los nevus displásicos y melanomas, por lo que el diagnóstico debe ser cuidadoso.

* Nevus genitales: Se trata de lesiones benignas, frecuentemente en mujeres jóvenes (premenopausicas), en la vulva o en genitales masculinos (18,19,20), pero que histopatológicamente pueden mostrar ciertas características similares al nevus displásico o melanoma, como un patrón de crecimiento asimétrico, células de gran tamaño, nucleolos eosinófilos visibles, e infiltrado linfocitario. El examen minucioso muestra maduración en el componente dérmico, y ausencia de mitosis o necrosis (**Figura I.3 B y D**).

* Nevus de la mama: Los nevus que se localizan en la mama (sin diferencia entre género), tienen rasgos más atípicos que en otras localizaciones, en particular, muestran: melanocitos intraepidérmicos prominentes, atipia melanocítica, y fibroplasia dérmica (21) (**Figura I.3 A y E**).

* Nevus acrales: Estos nevus se dan en el 4-9% de la población (22), en palmas y plantas de adultos (23,24,25). Histológicamente tienden a ser más celulares que los nevus comunes, y las células adoptan un patrón predominantemente lentiginoso, con ocasional migración pagetoide de células aisladas hacia el estrato espinoso, e incluso eliminación transepidérmica. Sin embargo, no son lesiones precursoras, o marcadoras de riesgo para el desarrollo de melanomas acrales (18) (**Figura I.3F**).

* Nevus en zonas de flexura: Como en las regiones acrales, otras localizaciones del cuerpo pueden mostrar nevus con un patrón lentiginoso, juntural peculiar, que dificulta el diagnóstico diferencial (26) (**Figura I.3G**).

* Nevus de cabeza y cuello: Algunos de los nevus que aparecen en cabeza y cuello

muestran rasgos que por otra parte serían raros en nevus comunes como células névicas en el tercio inferior de la dermis reticular, lo que podría sugerir un nevus congénito (27), patrón en nidos, irregular, con variabilidad en el tamaño y en la forma y frecuente localización entre las crestas (28).

2. Nevus en halo: Es una forma de aparición de los nevus melanocíticos benignos que se da preferentemente en la infancia y en edades jóvenes. Histológicamente son de predominio juntural, y se acompañan de un denso infiltrado linfocitario que frecuentemente oscurecen el componente melanocítico, y que le imprime un cierto grado de atipia nuclear (29,30).

3. Nevus antiguos: Varios estudios en adultos (> 40 años (31); o > 60años (32)), identifican un porcentaje de lesiones melanocíticas benignas de larga evolución con cierta atipia arquitectural o citológica, difícil de diferenciar de melanoma “in situ”.

4. Nevus combinado: Se refiere a la presencia de dos o más tipos diferentes de nevus en una única lesión. Son lesiones difíciles de diferenciar clínica e histológicamente de los melanomas (33).

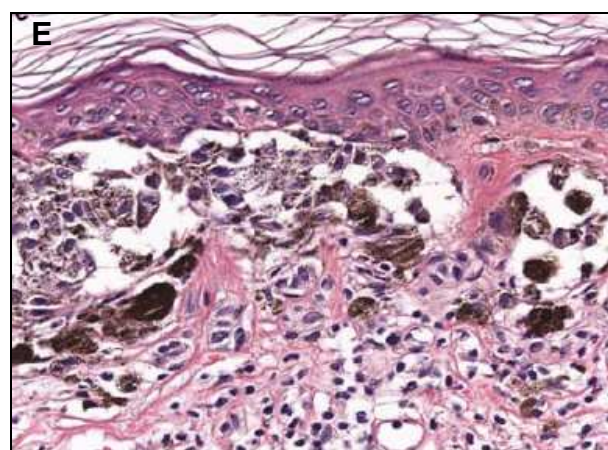
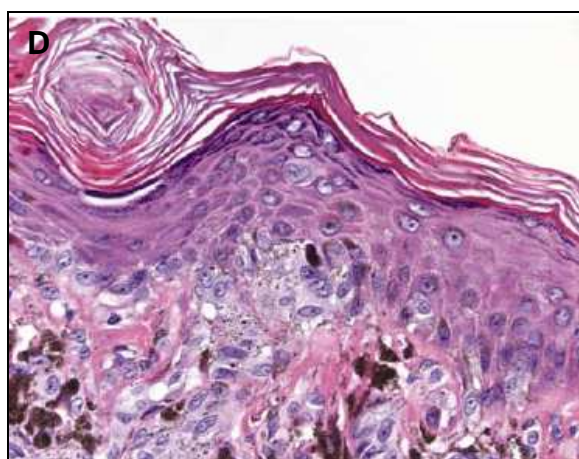
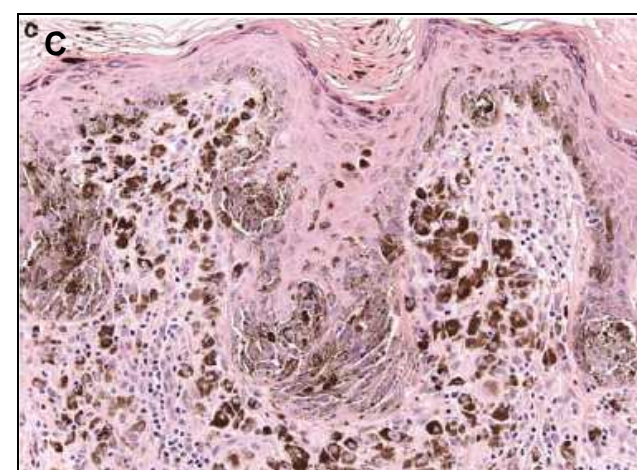
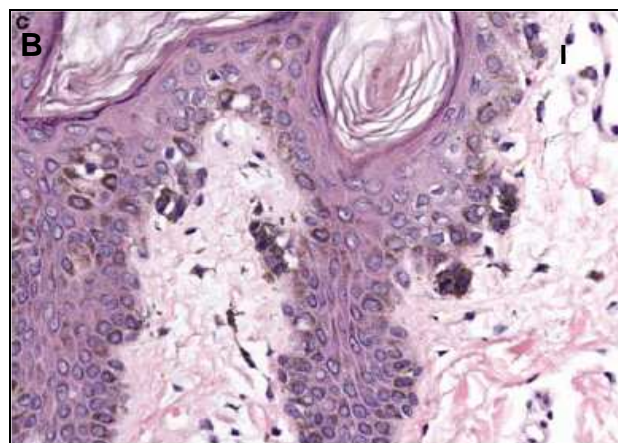
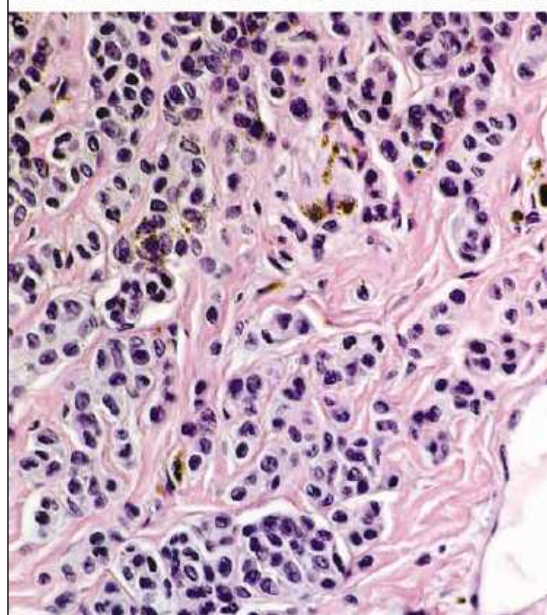
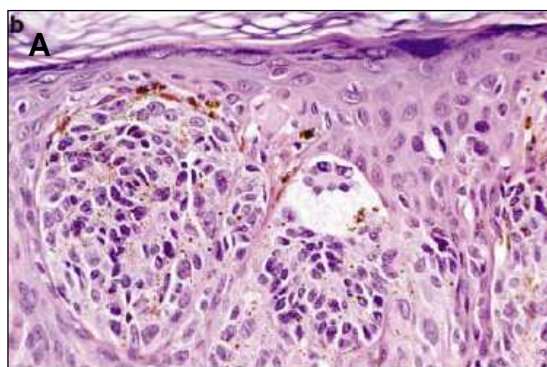
5. Otros nevus benignos:

* Nevus recurrentes y traumatizados: nevus benignos que han sido extirpados de forma incompleta por rasurado o por biopsia excisional, que vuelven a desarrollarse sobre la cicatriz con un patrón histológico juntural que se parece estrechamente a la histología del melanoma de extensión superficial (34). Este fenómeno se ha denominado “pseudomelanoma”.

* Nevus melanocítico y radiación UV: La exposición repetida a radiación UV en la piel induce un incremento en la proliferación de los melanocitos de la epidermis. Un nevus melanocítico previo adquiere una morfología que puede recordar a un melanoma clínicamente (31).

* Nevus profundos penetrantes: Estos nevus pueden simular histológicamente un melanoma porque presentan un denso infiltrado nodular de melanocitos que se extiende hasta la grasa del tejido celular subcutáneo, muestran ligera atipia, y aisladas mitosis (35).

* Nevus azul: Algunos de los llamados nevus azules pueden simular un melanoma clínicamente por ser de gran tamaño, y densamente pigmentados; a veces se presentan con pequeñas lesiones adyacentes que pueden simular metástasis satélites. En la mayoría de los casos el examen histopatológico revela el diagnóstico de nevus azul (36,37).



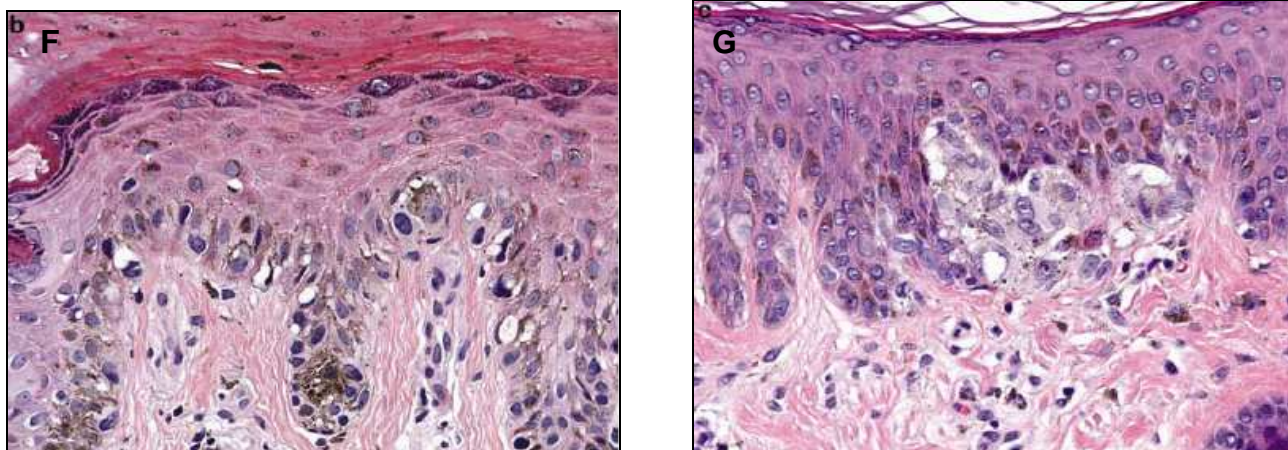


Fig. I.3. Nevus de localizaciones especiales. A. Nevus de la mama; B. Nevus del periné; C. Nevus en la axila; D. Nevus genital de la vulva “patrón en nidos y discohesivo”; E. Nevus atípico de la mama; F. Nevus acral-lentiginoso; G. Proliferación melanocítica juncional: Nevus en rodilla. Elder DE. *Modern Pathology*, 2006 (18)

2.3. Nevus displásicos

Los nevus displásicos fueron descritos en 1978 por dos grupos de investigación al mismo tiempo, el grupo de *Clark et al.* (38), y el de *Lynch et al.* (39). Estas lesiones se describieron en dos situaciones clínicas distintas: en pacientes que presentaban un gran número de nevus con historia familiar de melanoma, constituyendo el “*B-K mole syndrome*” según el grupo de Clark o el “*Familial atypical multiple mole melanoma syndrome*” (FAMMM) según Lynch. Posteriormente, se describió el “síndrome del nevus displásico esporádico” en relación con la presencia de un número menor de estos nevus en pacientes sin historia familiar de melanoma (40). No obstante, cabe destacar que aunque se describió en 1978, ya en el año 1820, *Norris* (41) y en 1950, *Cawley* (42), describieron la presencia de melanoma familiar en familias en las que muchos de sus miembros presentaban múltiples nevus además de melanomas. Desde la descripción de los nevus displásicos, las relaciones exactas con el melanoma familiar y con el riesgo de melanoma individual han sido fuente de controversia.

2.3.1. Controversias en relación con el nevus displásico

El principio de dicha controversia estriba en la definición básica de esta lesión, tanto desde el punto de vista clínico como histológico (43-60). *Clark* (38) inicialmente consideró hiperplasia melanocítica atípica como sinónimo de displasia melanocítica, caracterizada por la presencia de melanocitos aislados o en pequeños grupos, que presentaban alguna de las características típicas de los melanocitos malignos, cambios mesenquimales en la dermis papilar, infiltrado linfocitario y neoformación de vasos sanguíneos. El uso del término “displasia” fue el centro de múltiples polémicas; no existe una sola y única definición de “displasia” en patología general, y por eso su utilización lleva a la confusión (43, 47, 50-52). En este contexto,

se realizaron múltiples estudios para analizar las características histológicas de los mismos y buscar criterios microscópicos reproducibles. Algunos de los grupos daban mayor énfasis a las características arquitecturales, mientras que otros, consideraban además las características citológicas de los melanocitos (51).

A pesar de todos estos estudios, se realizaron dos reuniones de consenso en el NIH de los EEUU. La primera, cuyos resultados se publicaron en 1984, determinó que los criterios histológicos que definían el nevus displásico eran principalmente arquitecturales porque la atipia citológica, aunque frecuentemente observada, no se consideraba esencial (61). No obstante, dado que esta reunión no puso fin a la controversia, se realizó una segunda en 1992 (62), en la cuál se definió el *síndrome del nevus displásico*, como la presencia de un gran número de nevus (normalmente más de 50), algunos de ellos atípicos, de tamaño variable y con características histológicas distintivas, en pacientes en los que uno o más de los familiares de primer o segundo grado había tenido un melanoma. Estos pacientes presentaban un riesgo de melanoma en su vida del 100% si vivían más de 70 años. Asimismo se determinó que existían individuos con este tipo de lesiones fuera de un contexto familiar de melanoma y con un número inferior de nevus atípicos, que presentaban un mayor riesgo de desarrollar melanoma que la población general, aunque inferior al de los casos familiares de melanoma. Además en esta reunión, se definieron las características clínicas e histológicas de los nevus “displásicos”. Desde el punto de vista histológico, se puso énfasis en las características arquitecturales y la atipia de los melanocitos, sugiriéndose que clínicamente se utilizara el término “nevus atípico” e histológicamente el de “nevus con alteración arquitectural y atipia citológica de los melanocitos, con una estimación del grado de atipia”, ya que algunas de las lesiones podían presentar muy pocos melanocitos atípicos, mientras que en otras la atipia melanocítica podía ser tan extensa y severa que el diagnóstico diferencial con el melanoma *in situ* podría ser muy difícil (62). Este último punto, la gradación de la atipia, se convirtió entonces en una nueva fuente de controversia por su difícil reproducibilidad (63,64).

La presencia de nevus con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos (NAA) en individuos fuera del contexto familiar del síndrome, obligó a realizar estudios sobre su prevalencia en la población. Los resultados variaban entre un 1,8-18% (65-72), destacando los trabajos de *Crutcher y cols.* (67), que establecieron que la prevalencia de los NAA en la población de Napa Valley de California (EE UU) era del 4,9%, con confirmación histológica, a diferencia de la mayoría de los trabajos publicados al respecto, que se basaban mayoritariamente en los hallazgos clínicos. A pesar de todo ello, las críticas se exacerbaban en contra del concepto de nevus displásico, encabezadas principalmente por el grupo de *Ackerman* (43,44,47).

2.3.2. Características clínicas e histopatológicas

Según Clark, correspondían clínicamente a lesiones pigmentadas de forma irregular y coloración variable de más de 5 mm de diámetro (43). Desde el punto de vista clínico, se han

realizado muchos estudios para valorar sus características y para estudiar los criterios más adecuados, el grado de reproducibilidad de los mismos y la correlación con los hallazgos histológicos (73-76). Actualmente, se considera que clínicamente se caracterizan por cuatro rasgos mayores: 1º su tamaño tiende a ser mayor que el de los nevus comunes, pero menor que el de los melanomas; y se definen como lesiones de 5 mm o mayores; 2º suelen tener un componente juntural, que clínicamente produce una lesión macular o plana, con una superficie rugosa; 3º los bordes suelen ser poco definidos; y, 4º suelen mostrar variaciones en la pigmentación, con áreas marrones parduscas más o menos oscuras (74).

Hoy día se acepta que histológicamente, los nevus displásicos presentan alteraciones arquitecturales y citológicas. Arquitecturalmente, presentan un componente juntural en forma de “hombro” adyacente al componente papilar “cabeza”. En otras lesiones no existe el componente dérmico, y la lesión es completamente juntural. Especialmente en el componente juntural existe un incremento del número de melanocitos aislados con distribución lentiginosa a lo largo de la capa basal epidérmica, o formando pequeños nidos predominantemente en las puntas y los laterales de las papilas, con tendencia a la fusión y unión de crestas. Las crestas tienden a ser uniformes e irregularmente alargadas en los nevus displásicos, mientras que en los melanomas puede haber atrofia o hiperplasia irregular de la epidermis con una tendencia al “borramiento” de las crestas. En la dermis se observa fibroplasia, típicamente concéntrica, eosinofílica o fibroplasia lamelar. En melanomas, es más frecuente la fibroplasia difusa frecuentemente asociada a un infiltrado linfocitario “en banda”. Citológicamente, los melanocitos presentan atipia aleatoria caracterizada por agrandamiento nuclear con ligera irregularidad e hiper cromasia, a veces con nucleolo prominente (**Figura I.4 A y B**). Las características histológicas de los nevus displásicos se superponen en cierta medida con las de algunos tipos “especiales” de nevus melanocíticos (los nevus lentiginosos, acrales, genitales, etc) y con melanomas en fases tempranas, aunque existen criterios clínicos e histológicos que permiten su distinción (**Tabla I.1**) (76).

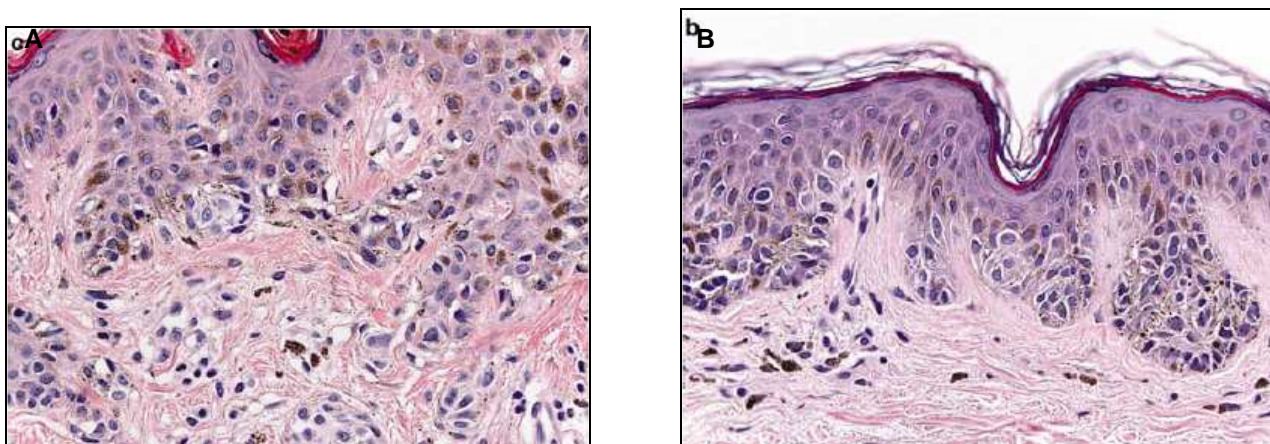


Fig I.4. A y B. Nevus displásicos con atipia arquitectural y citológica moderada

Características	Melanoma	Nevus displásico	Nevus
General			
Tamaño	Mayor	Intermedio	Menor
Simetría	Pobre	Buena	Buena
Patrón arquitectural			
Tecas	Variable	Predominante	Predominante
Disposición	Coalescentes	Fusión	Discreto
Lentiginoso	Continuo	Discontinuo	Discontinuo
Pagetoide	Extenso	Focal, mínimo	Mínimo
Punta papilas	Irregular	Elongadas	Uniformes
Citología			
Melanocitos	Epitelioides	Mixtos	Nevoides
Atipia nuclear	Atipia uniforme	Atipia aleatoria	Minima
Mitosis	1/3 de casos	Ausente	Ausente
Respuesta estromal			
Fibroplasia	Difusa	Concéntrica	Minima
Linfocitos	En banda, liquenoide	Parcheado, perivascular	Mínimo
Regresión	Frecuente, extensa	Raro, mínimo	Ausente

Tabla I.1. Comparación de las características de melanoma (fase de crecimiento radial), nevus displásico y nevus común. Rhodes et al. JAMA, 1987 (76).

2.3.3. Importancia del diagnóstico: nevus displásico y melanoma

Los nevus displásicos son los simuladores más importantes de melanoma, así como marcadores de riesgo y potenciales precursores de melanoma. La importancia del diagnóstico de los nevus displásicos es por su condición de precursores de melanoma, aunque sólo un pequeño porcentaje de estas lesiones van a progresar (18), lo que se estima en un 20-40% de los casos, según algunos estudios (77-81).

Sin embargo, la mayoría de los melanomas no aparecen en asociación con un nevus primario, son los llamados casos “esporádicos” (82-83). La prevalencia de los nevus displásicos es mayor en la población que la de los melanomas.

2.3.4. Tratamiento y prevención

Un punto a destacar es el que hace referencia a la actitud terapéutica y preventiva de los pacientes que presentan NAA. Por lo que se refiere a los casos familiares, está claro que deben ser controlados de cerca y de forma frecuente, recomendándose la utilización de métodos fotográficos, y según la mayoría de los autores, la exéresis sólo de las lesiones más atípicas o de aquellas que han cambiado sus características (84). El hecho de que estos pacientes a lo largo de su vida, desarrollen nevus atípicos, que clínicamente involucionan, hace desistir de la actitud de extirpar todos o la mayoría de los nevus atípicos (85,86). En los casos no familiares o esporádicos, el control del paciente debe realizarse pero no de forma tan frecuente, dependiendo de la auto-revisión y la toma de precauciones con respecto a la protección solar. Un punto a tener en cuenta es la vista de conjunto (realización de *screenings*) para detectar la población de riesgo. En este sentido, el estudio de la relación coste-beneficio no aconseja poner en práctica muchos programas de prevención a gran escala para detectar la población de riesgo sobre todo en países europeos, a diferencia de los EEUU donde sí existen muchos programas voluntarios para estudiar la población general. No obstante, si se aconseja realizar campañas publicitarias informativas sobre las medidas preventivas a tomar de forma individual (87).

2.4. Nevus de Spitz

En 1910, *Darier y Civatte* (88) describieron una proliferación melanocítica muy poco frecuente (Spitzoide) que se desarrollaba rápidamente en la nariz de un niño en edad pediátrica y observaron una importante dificultad para dilucidar esta dicha lesión era benigna o maligna. Posteriormente, *S. Spitz* (89) caracterizó un tipo especial de lesiones melanocíticas, que definió como “melanoma juvenil”, indicando así que no consideraba estas lesiones como un grupo de lesiones névicas de la infancia inequívocamente benignas, pero tampoco como melanomas malignos. Más de medio siglo más tarde, nos seguimos planteando si se han hecho grandes avances sobre esta misma cuestión: la interpretación histológica de las lesiones Spitzoides, y de su potencial maligno. Por supuesto, los estudios no han cesado y se han establecido una serie de criterios que permiten diferenciar la mayoría de los nevus de Spitz del melanoma (90).

El nevus de Spitz es un nevus melanocítico poco frecuente, habitualmente adquirido, compuesto por células grandes, poligonales (epitelioides) y fusiformes. Su importancia radica en el hecho de que en algunos casos es muy difícil diferenciarlo del melanoma.

2.4.1. Características clínicas e histopatológicas

La forma clásica del nevus de Spitz se describe como una pápula, bien circunscrita, de superficie lisa, y de color rojizo que puede confundirse con una lesión vascular, localizada en la cara de un niño. Pese a esta imagen estereotipada que se describe en los libros de dermatología, existen otras variantes clínicas, algunas de las cuales son tan frecuentes o más que la descrita. Un porcentaje importante de nevus de Spitz se desarrolla en jóvenes o en adultos (91). Y, aunque la mayoría de los textos describen la cara como su localización más frecuente, lo más común es que la lesión asiente en las extremidades inferiores o en el tronco (92,93). También se han comunicado nevus de Spitz en mucosas (94).

No es fácil describir las características histopatológicas del nevus de Spitz debido a las numerosas variantes que han sido publicadas. Constantemente, la lesión está constituida por melanocitos más grandes que los de un nevus común, y de morfología epiteliode o fusiforme. La frecuente presencia de pleomorfismo nuclear, así como infiltrado inflamatorio y la posible existencia de figuras de mitosis, hacen que se pueda confundir con un melanoma. Es característica la presencia de glóbulos eosinófilos en la epidermis (95), cuerpos de Kamino, en el 60% del conjunto de todos los casos, y en el 75% de los juncutales. Tales glóbulos son PAS positivos y diastasa resistentes (corresponden a cúmulos de queratinocitos y melanocitos degenerados) (92). Raramente se observa extensión pagetoide de los melanocitos individuales dentro de la epidermis (92).

2.4.2. Recuerdo histórico

La controversia en torno al nevus de Spitz se inició ya desde el mismo momento de su descripción original en 1948 por *Sophie Spitz* (89). *Spitz* observó que algunas lesiones

diagnosticadas por ella como melanomas en edad pediátrica tenían un comportamiento mucho mejor que los melanomas de la edad adulta, y por ello los denominó melanomas juveniles. Su artículo se tituló "*Melanomas juveniles*", considerando que este grupo de lesiones no eran nevus inequívocamente benignos, ni melanomas malignos del adulto. Spitz concluyó que en la mayoría de los casos el diagnóstico diferencial histológico entre el "melanoma juvenil" y el melanoma del adulto era imposible, y lo evidenció reportando un caso (de los 13 que aportó) que desarrolló metástasis. Para ella el único hallazgo propio de los melanomas infantiles y que no aparecía en los del adulto era la presencia de células gigantes en el 50% de los casos. Debido a que no encontraba diferencias histológicas entre el melanoma del adulto y el infantil, Spitz supuso una influencia hormonal como causa del curso benigno de los melanomas infantiles, y recomendó tratarlos con cirugía conservadora.

Numerosos estudios posteriores han ido perfilando y ampliando el espectro clínico-patológico del nevus de Spitz hasta nuestros días. En 1949, *Allen*, incluyó los melanomas juveniles en el grupo de las neoplasias melanocíticas benignas (96). El estudio de *Réné Echevarría y Lauren V Ackerman* (91), en 1967, estableció claramente que el nevus de Spitz no era un tumor exclusivamente pediátrico, aunque este hecho ya había sido reconocido en 1953 por *Allen y Spitz* (97).

En 1989, *Smith et al.* (98) publicaron un estudio de lo que denominaron "*Nevus de Spitz maligno*". Se trataba de una serie de 32 lesiones melanocíticas con hallazgos histopatológicos superponibles a los del nevus de Spitz clásico, pero con un diámetro superior a 1cm y con extensión en profundidad hasta el tejido celular subcutáneo, un elevado índice mitótico, mitosis en profundidad, ulceración, mayor grado de atipia, y ausencia de maduración en profundidad. En 6 pacientes existían metástasis en los ganglios linfáticos regionales pero no más allá. Todos los casos que disponían de seguimiento (30 de los 32) estaban vivos y libres de enfermedad tras un seguimiento medio de 6 años. Pese al título de la publicación, los autores concluyeron que el comportamiento relativamente benigno de estos casos sugería que las metástasis linfáticas de algunos nevus de Spitz atípicos no constituían un criterio suficiente para predecir un comportamiento biológicamente maligno. Aunque posteriormente otros autores han apoyado la existencia de nevus de Spitz malignos como habían propuesto *Smith et al.*, describiendo casos similares (100-101), sus trabajos también han sido objeto de críticas.

2.4.3. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial más importante del nevus de Spitz es con el melanoma. La importancia de este diagnóstico se debe, no sólo a que ésta es la entidad con la que se confunde con mayor frecuencia, sino también a que tal confusión puede tener gran trascendencia, dando lugar a tratamientos agresivos innecesarios y pronósticos sombríos.

A día de hoy, el diagnóstico diferencial entre un nevus "atípico" y un melanoma se sigue apoyando en criterios histopatológicos, es decir morfológicos y por tanto siempre sujetos a cierta subjetividad. El problema es que los criterios histopatológicos se obtienen siempre de los casos típicos, los que no suponen en la práctica auténticos problemas de diagnóstico

diferencial, pero tales criterios deben ser aplicados a los casos difíciles, es decir a aquellos casos del espectro que suelen compartir rasgos de benignidad y de malignidad, y por tanto en tales casos debemos asignar mayor o menor valor a dichos criterios, e interpretarlos con la mayor prudencia y sentido común. El 5-10% de los nevus de Spitz son junturales y se caracterizan por una proliferación celular florida en la unión dermo-epidérmica, que hasta en un 38% de los casos se acompaña de melanocitosis pagetoide (102), lo que dificulta el diagnóstico diferencial con el melanoma *in situ*. Esto es especialmente relevante en la variante de nevus de Spitz pagetoide (103), que se caracteriza por una proliferación de grandes melanocitos epitelioides, predominantemente intraepidérmicos, con una distribución pagetoide. La dificultad en el diagnóstico de los nevus de Spitz quedó demostrada claramente por *Barnhill y cols.*, (104) en un estudio en el que mostraron lesiones spitzoides difíciles a un grupo de expertos dermatopatólogos, encontrando importantes discrepancias, así como errores de diagnóstico (demostrables ante la interpretación como nevus de Spitz de lesiones que habían producido metástasis). Pese a todo, aunque existen casos difíciles en los que no se puede establecer un diagnóstico de seguridad, pensamos que son pocos en la práctica y en la mayoría de los casos contamos con criterios muy útiles para diferenciar la gran mayoría de los nevus y los melanomas.

El nevus fusocelular pigmentado de Reed es una entidad histopatológica estrechamente relacionada con el nevus de Spitz, con frecuentes características histopatológicas comunes (105,106). Histológicamente está constituido predominantemente por nidos confluentes de células fusiformes. Como en los nevus de Spitz, las lesiones tempranas pueden simular melanoma *in situ*. Además, existen formas atípicas con importante extensión lateral, hiperplasia melanocítica lentiginosa y atipia citológica en las células fusiformes (107).

3. Melanoma

El melanoma es la neoplasia maligna que se origina a partir de los melanocitos. La primera descripción de un melanoma aparece en los escritos de *Hipócrates*, en el siglo V antes de J.C, también, se ha detectado la enfermedad en varias momias incas precolombinas de aproximadamente la misma época (108).

La primera publicación moderna sobre un paciente con la enfermedad, se debe a *John Hunter* en 1787. Inicialmente, la enfermedad fue denominada “melanosis” término acuñado por René Laennec en 1812 (108).

El término melanoma fue sugerido por primera vez por *Robert Carswell* en 1838. En 1907, *William Sampson Handley* describió las vías anatómicas de diseminación y su extensión linfática centrífuga (108).

3.1. Embriología

Los melanocitos derivan de células pluripotenciales de la cresta neural, al igual que diversos tipos celulares como neuronas, células gliales y células secretoras del sistema neuroendocrino periférico. Sus precursores, conocidos como melanoblastos, emigran durante el primer trimestre de la gestación para poblar diversas regiones tisulares, como la piel, úvea, meninges y mucosa ectodérmica. La diferenciación progresiva de los melanoblastos en la piel durante el desarrollo embrionario, fetal y neonatal produce los melanocitos maduros de la epidermis del adulto, que son células dotadas de un citoplasma con marcadas prolongaciones o dendritas, y fuertemente pigmentadas. La regulación específica de algunos antígenos durante el proceso de diferenciación de los melanoblastos, sugiere que su expresión, es característica de los precursores de los melanocitos (109).

La migración de los melanoblastos desde la cresta neural y su entrada en el estrato epidérmico y en folículos pilosos, es un proceso que requiere la digestión proteolítica de la matriz extracelular. De esta forma, cuando las células de la cresta neural en proceso de diferenciación se orientan hacia el linaje melanocítico, activan un programa de expresión genética que les concede la capacidad de invadir y migrar. Los melanoblastos en fase de migración deben ser capaces de reconocer y seguir “pistas” moleculares que los lleven a su correspondiente destino. Una vez en él, la diferenciación posterior debe incluir la desactivación del programa de expresión genética para la migración. Se cree que su reactivación, puede ser uno de los principales pasos que llevan a los melanocitos atípicos, que crecen autónomamente de forma localizada, a convertirse en células metastatizantes capaces de migrar e invadir. Por tanto, las investigaciones más recientes se centran en los aspectos moleculares de los mecanismos responsables de esta reactivación, que podrían ser dianas de nuevos métodos terapéuticos encaminados a combatir la enfermedad diseminada (109.110).

En la piel, los melanocitos se sitúan en la capa basal de la epidermis, y bajo el estímulo de dos hormonas, hormona estimuladora del melanocito (MSH-alfa) y hormona adrenocorticotropa (ACTH), elaboran pigmento melánico. Se considera que MSH-alfa, además, puede desempeñar cierto papel en el mantenimiento de la diferenciación de estas células.

3.2. Epidemiología

El cáncer de piel es el más frecuente de todos los cánceres humanos, representa más del 50%. El melanoma supone el 3-4% de las neoplasias cutáneas, aunque sin embargo, es el responsable de la gran mayoría de las muertes debidas a cánceres de piel (hasta el 65%) (111), y en un contexto más general, a él se le atribuyen el 1% de las muertes por cáncer de cualquier etiología (112).

La incidencia de esta neoplasia ha ido creciendo de manera exponencial en la población mundial. En Europa, la incidencia del melanoma también ha aumentado espectacularmente, se calcula que en la última década su diagnóstico ha crecido

aproximadamente un 60% (113). El melanoma afecta a todos los países del mundo, aunque históricamente, países como Chile y Australia han tenido las tasas de melanoma más elevadas (114). La agresividad de este tumor y el aumento de su incidencia en la población general mundial más rápidamente que otros tumores, han hecho del melanoma un objetivo prioritario en los programas de prevención y salud pública de muchos países (111-114).

El melanoma es un tumor típicamente de adultos, aunque suele aparecer en personas más jóvenes que la mayoría de los otros tipos de cáncer. La mitad de los melanomas se detectan en personas menores de 57 años de edad. Existe un pico diagnóstico en la cuarta década de la vida. Sin embargo los adolescentes también pueden desarrollar melanoma y, es excepcional en la infancia. Es más frecuente en hombres que en mujeres (114).

El melanoma puede aparecer en cualquier localización de la superficie cutánea, pero con mayor frecuencia en el tronco en varones de piel clara y, en la parte inferior de las piernas en mujeres de piel clara (111). En la raza negra se presenta con menor incidencia, ya que la alta cantidad de melanina tiene un efecto protector en su aparición, aunque no en su pronóstico, una vez que se presenta la enfermedad (115). Los individuos de raza negra pueden desarrollar melanomas que con más frecuencia afectan a las palmas, las plantas, y región subungueal. También hay que recordar que existen melanomas de mucosas, como coroides, boca, vagina, esófago, intestino grueso, etc (111).

Recientes publicaciones plantean la posibilidad de que este aumento en la incidencia del melanoma no sea tan alarmante, y jueguen un papel importante las campañas de prevención y detección precoz, que están detectando lesiones en estadios muy iniciales. Un dato a favor de esta hipótesis es que la mortalidad del melanoma ha aumentado, aunque no de la misma forma exponencial que la incidencia, de hecho, la ACS (*American Cancer Society*) habla de una estabilización en la mortalidad del melanoma en los últimos años (111). Si tenemos en cuenta que los tratamientos del melanoma no han evolucionado sustancialmente, los datos de la ACS que hacen referencia a la estabilización en las tasas de mortalidad, a pesar del aumento en la incidencia, nos orienta a pensar en un cambio en la distribución diagnóstica en los estadios del melanoma. De hecho, se ha constatado que la incidencia de lesiones menos invasivas (menos de 0,1mm de espesor de Breslow) ha aumentado más rápidamente que la de los melanomas más profundos (más de 1mm de espesor de Breslow). De cualquier forma hay que tener en cuenta que estamos ante un tumor del que no existe ningún dato bioquímico, ni test de “*screening*” que nos permita hacer un diagnóstico precoz en un estadio “preclínico” (112).

La mortalidad en el melanoma se ha relacionado con el sexo y la edad, de la misma forma que la incidencia, varones de edad avanzada presentan las mayores tasas de mortalidad independientemente de su raza o patrón de exposición solar (116,117).

3.3. Etiología

A pesar de los últimos avances sobre la biología de la enfermedad, en la actualidad son

insuficientes los datos de que se dispone sobre su etiología, y sobre todo respecto a sus posibles mecanismos causales. El factor más claramente relacionado con la aparición del melanoma parece ser la radiación solar, sobre todo los rayos ultravioleta.

3.3.1. Radiación solar

Entre las radiaciones electromagnéticas actínicas se encuentran los rayos ultravioleta, que se dividen en tres bandas: UVC, con longitud de onda de 200-290 nm, UVB, de 290-320 nm, y UVA, de 320-400 nm. Todas las radiaciones UVC y muchas de las UVB son absorbidas por la capa de ozono de la atmósfera terrestre. No está claro qué longitudes de onda son las más activas en la patogenia del melanoma en la raza humana. No obstante, se sabe que las radiaciones ultravioletas actúan sobre la piel estimulando directamente la producción de tumores, ya que suprimen el sistema inmunológico cutáneo, producen lesiones moleculares en los melanocitos (sobre todo en su ADN) y estimulan su división celular y producción de melanina. Se ha observado que la incidencia de melanoma es mayor en latitudes más cercanas al ecuador. Por otra parte, este tumor suele aparecer con mayor frecuencia en zonas corporales expuestas. Pero es de destacar que la incidencia es mayor en sujetos que toman el sol de forma intermitente e intensa, como jóvenes de ambientes urbanos, profesionales y administrativos, a diferencia de otros tumores cutáneos, que obedecen más al efecto acumulativo de la exposición solar prolongada y continua. La presentación ocular, a diferencia de la cutánea, no parece estar relacionada con la exposición solar (109,119).

El fenotipo cutáneo, consistente en la propensión a la quemadura solar y en sus rasgos de pigmentación, como el color de ojos, pelo, piel y la tendencia a la aparición de pecas, presenta una clara asociación con el cáncer de piel. Los individuos más sensibles son de piel muy clara, ojos azules o verdes, pelo rubio o rojizo, pecosos y con fototipo cutáneo I de Fitzpatrick (siempre se queman y nunca se broncean). Una excepción son los sujetos albinos, que quemándose fácilmente, presentan un riesgo muy alto de cáncer cutáneo no melanoma, sobre todo carcinoma de células escamosas, y un riesgo de melanoma mucho menor (109).

Además, es característico el caso de los pacientes con *xeroderma pigmentosum*, un defecto genético humano poco frecuente que consiste en la alteración de los mecanismos de reparación del ADN, en los que, en presencia de radiación ultravioleta, aparecen alteraciones celulares en la piel que se traducen en una altísima incidencia de tumores cutáneos; para ellos, el riesgo de melanoma antes de los 20 años de edad es 2000 veces mayor que en la población general (109).

La radiación ultravioleta puede además aumentar los niveles de factores de crecimiento en los tejidos, por mutación/activación de protooncogenes, siendo muchos de estos factores (melanotropinas) estimulantes de melanocitos (109).

3.3.2. Factores químicos

Se ha observado cierta asociación entre la aparición de melanomas y la exposición (en concreto laboral) a ciertos productos químicos; entre ellos bifenilos policlorados (PCB) y cloruro

de polivinilo (PVC). También se ha asociado, en el terreno farmacológico, con beta-bloqueantes (109).

3.3.3. Factores hormonales

Su papel es poco claro, siendo la tasa de incidencia similar en ambos sexos, aunque las mujeres tienen un pronóstico global mejor que los hombres, ventaja que desaparece tras la menopausia. Algunos estudios asocian mayor incidencia de melanoma a la ingesta de anticonceptivos orales, sobre todo si tiene lugar durante un período superior a 5 años; sin embargo, no está confirmado. La influencia del embarazo es muy discutida, con resultados contradictorios (109, 119).

3.3.4. Factores genéticos

- **Carácter familiar del melanoma:** En 1820, *Norris* describió por primera vez la variante hereditaria, confirmada posteriormente en numerosos estudios. Actualmente se conoce que el 0,4-12,3% de los pacientes, tienen historia familiar positiva, de hecho, familiares consanguíneos de primer grado de pacientes con melanoma tienen 1,7 veces más probabilidad de desarrollarlo que la población general, apareciendo la neoplasia a edades más precoces. En los pacientes afectos de melanoma familiar, la incidencia de aparición de primarios múltiples es del 12,3%, frente a un 2,8% en la población general (109,120). La asociación con otros tumores en el ámbito familiar no es significativa, pero sí con genodermatosis como xeroderma pigmentosum (109).

- **Lesiones precursoras:** Se ha acuñado el término “síndrome del nevus displásico” (SND), ahora más conocido como “síndrome del nevus atípico”, para describir un conjunto de lesiones clínicas e histológicas que se heredan de forma autosómica dominante. Los pacientes afectos presentan múltiples nevus que aparecen en la adolescencia, aunque pasados los 35 años sigan desarrollando nuevas lesiones. Este síndrome se asocia tanto al melanoma familiar como al esporádico, aunque, si el paciente tiene antecedentes familiares, el riesgo de desarrollar la enfermedad es prácticamente del 100%. Por tanto, en estos casos es obligatorio realizar revisiones periódicas cada 6 meses, y extirpar toda lesión sospechosa (109).

- **Estudios citogenéticos:** En los últimos años, los avances en las técnicas de mapeo genético han permitido localizar e identificar numerosos genes causantes de enfermedades. En el caso del melanoma, se han detectado varios genes asociados. El *melanoma ocular*, raro (9%), pero a menudo mortal por su diagnóstico tardío, se asocia a monosomías del cromosoma 3, a duplicaciones del brazo largo del cromosoma 8, y a alteraciones del cromosoma 6 (duplicación del brazo 6p o delección del 6q), 7 y 9. El *melanoma cutáneo* se asocia a otras alteraciones diferentes, localizadas sobre todo en cromosomas 1, 6, 7, 9, 11, 10, 22 e Y. El gen que más se ha estudiado, por desempeñar un papel predominante en el desarrollo neoplásico, es el del inhibidor de quinasas dependiente de ciclina 2 (CDKN2) o p16INK4a, localizado en la banda p21 del cromosoma 9. Este gen se encuentra alterado con mucha frecuencia en las líneas celulares de melanoma y también en pacientes con presentación familiar. Este gen

codifica proteínas relacionadas con el control de ciclo, pero aún no se ha definido su papel específico. También se encuentra alterado en otros tipos de cáncer, y su asociación con la forma esporádica, es menos frecuente (109).

3.4. Patogenia

En el caso del melanoma, se desconocen los efectos genéticos y bioquímicos que transforman al melanocito, una célula que raramente prolifera en la piel adulta normal, en una célula capaz de replicarse dando lugar a un tumor muy invasivo y a menudo fatal. La etiología del melanoma cutáneo probablemente es multifactorial (120,121), e implica los efectos complejos de la exposición intermitente a la radiación ultravioleta, el genotipo, el fenotipo y la inmunocompetencia de cada individuo. La progresión biológica del melanoma refleja una alteración progresiva en el complemento genético del melanocito, que en estado no transformado dispone de barreras múltiples e independientes para la transformación oncogénica (121). La rotura de estas barreras depende del cúmulo gradual de alteraciones irreversibles en un número desconocido de genes, por lo que tendremos que considerar que el modelo a aplicar es un modelo multicausal (122).

3.5. Clínica

El melanoma cutáneo se puede detectar precozmente, cuando todavía es potencialmente curable. Manchas en la piel que cambien de tamaño, de forma o de color deben ser evaluadas, de la misma manera que los cambios que se puedan producir en la piel de alrededor de la lesión, picor, sangrado, etc. Es importante recordar en este punto que el pigmento melánico puede estar presente en otros tumores cutáneos distintos de nevus y el melanoma, como por ejemplo queratosis seborreica, los carcinoma basocelular, y excepcionalmente carcinoma epidermoide, schwanoma, y dermatofibrosarcoma protuberans (123).

La clave en la clínica del melanoma es aprender a diferenciar un nevus de un melanoma, para ello debemos recordar que una vez que se desarrolla un nevus, habitualmente suele permanecer de la misma forma y tamaño, salvo si sufre fenómenos de regresión. Existe una regla establecida de carácter general, sintetizada en el acrónimo ABCDE, que nos ayuda a distinguirlos en estadios precoces (1):

- **A**simetría de la lesión pigmentada
- **B**ordes irregulares
- **C**olor: no resulta uniforme en toda la superficie de la lesión
- **D**íámetro: resulta sospechosa si la lesión pigmentada tiene un diámetro mayor de 6mm; aunque últimamente se están describiendo melanomas entre 3 y 6mm.
- **E**levación sobre la superficie cutánea.

En cualquier caso, siempre existen excepciones, y hay melanomas que no cumplen esa regla, estos son los casos que más atención merecen clínicamente.

3.6. Anatomía Patológica

La peculiar forma de progresión tumoral del melanoma dicotomiza su historia natural en dos fases: fase de crecimiento radial, en la que el potencial metastático es prácticamente nulo, y fase de crecimiento vertical en la que el tumor adquiere la capacidad de metastatizar. Se define de acuerdo a unos criterios microscópicos establecidos en la literatura (121,124):

- *Fase de crecimiento radial:* el melanoma es intraepidérmico o microinvasivo y está compuesto por células tumorales aisladas dentro de la epidermis o en pequeños nidos de menos de 15 células en dermis papilar. No es frecuente observar figuras de mitosis en el compartimiento infiltrante. Y, con frecuencia se asocia con un denso infiltrado linfoplasmocitario (121, 124).

- *Fase de crecimiento vertical:* se considera que un melanoma está en fase de crecimiento vertical, si invade la dermis reticular o si ocupa la dermis papilar en forma de nidos expansivos de más de 15 células, o de mayor tamaño que aquellos presentes en la epidermis. Las células tumorales suelen ser pleomórficas con abundante apoptosis. Y las mitosis son frecuentes (121, 124).

Estas dos fases no siempre están presentes en todas las muestras de melanoma, pero el identificarlas proporciona una información esencial en su clasificación y futura evolución clínica (121). Existe un subtipo histológico de melanoma, el melanoma nodular, en el que no se identifica la fase de crecimiento radial, asumiendo que tiene capacidad metastásica desde el principio.

El desarrollo de metástasis es el resultado de una serie de eventos que incluyen la discohesión celular en el tumor primario, la invasión de la membrana basal y la migración hacia el torrente sanguíneo o a la circulación linfática, por donde pueden llegar a producir la invasión y crecimiento en otros órganos. Dependiendo en que fase de crecimiento esté, el pronóstico cambia de forma dramática. Actualmente, la mayoría de los trabajos de investigación en melanomas están orientados a buscar diferencias biológicas sustanciales entre estas dos fases de crecimiento y en particular, posibles cambios moleculares puntuales en las células neoplásicas en fase radial y en fase vertical que nos permitan predecir la evolución de las lesiones.

Existen cuatro subtipos clásicos de melanoma (125), que en orden decreciente de frecuencia son: el melanoma de extensión superficial, el melanoma nodular, el léntigo maligno melanoma, y el melanoma lentiginoso acral. Asimismo, existen numerosos subtipos poco frecuentes, entre los que cabe destacar el nevus azul celular maligno (126), el melanoma desmoplásico (127), el melanoma nevoide (128), melanoma de células en anillo de sello (129), etc. La distinción clínica entre los diferentes subtipos clásicos no siempre es fácil, pero en general, suele estar relacionada con una localización anatómica determinada.

- Melanoma de extensión superficial (MES): es la variedad más común, y constituye

alrededor del 70% de los melanomas cutáneos (125). Es la forma clínica predominante en familiares directos de pacientes previamente diagnosticados de melanoma. Tiene una fase de crecimiento radial intermedia y normalmente en el momento del diagnóstico suele ser al menos superficialmente invasivo.

Histopatológicamente, se caracterizan por una proliferación de melanocitos atípicos, formando nidos o tecas que se extienden de forma aislada dentro de la epidermis. El componente infiltrativo suele estar formando nidos o masas sólidas que infiltran difusamente la dermis (**Figura I.5**). Las células neoplásicas pueden ser epitelioides, nevoides o mas raramente fusiformes y no presentan signos de maduración en las capas profundas de la dermis. El grado citológico de atipia es variable de un caso a otro (130).

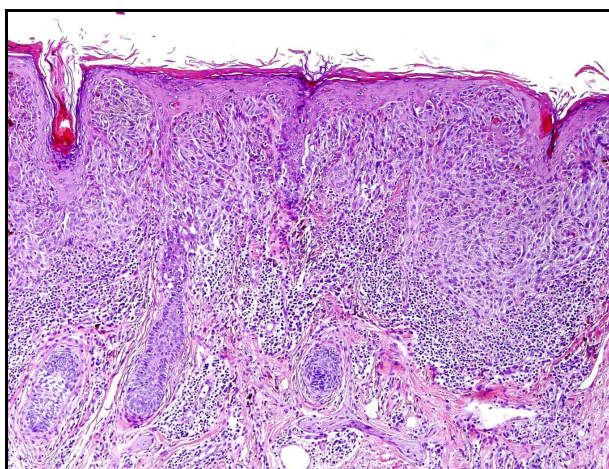


Fig I.5. Imagen histológica del melanoma de extensión superficial

- Melanoma nodular (MN) supone entre el 10-15% de los melanomas, siendo por su frecuencia la segunda forma clínica (125). Habitualmente se trata de un tumor maligno de melanocitos epidérmicos que aparece de “novo” sobre una piel normal sin fase de crecimiento radial preexistente. Inicialmente comienza con un crecimiento vertical, aunque también puede asociarse a nevus previos (131,132).

Macroscópicamente, suelen ser nodulares, polipoides y ocasionalmente pedunculados, de color muy oscuro incluso a veces azulados. Pueden aparecer en cualquier localización, aunque es más habitual en el tronco. Es frecuente que se ulceren, y es la forma de melanoma con mayor riesgo de metastatizar.

Histopatológicamente, se caracterizan por presentar masas sólidas de células atípicas en la dermis con escaso componente intraepidérmico (**Figura I.6**). La morfología celular es variable, con frecuencia son células redondeadas u ovales con aspecto epiteliode, que como en todos los melanomas no maduran en las capas profundas de la dermis y suelen presentar numerosas mitosis (1).

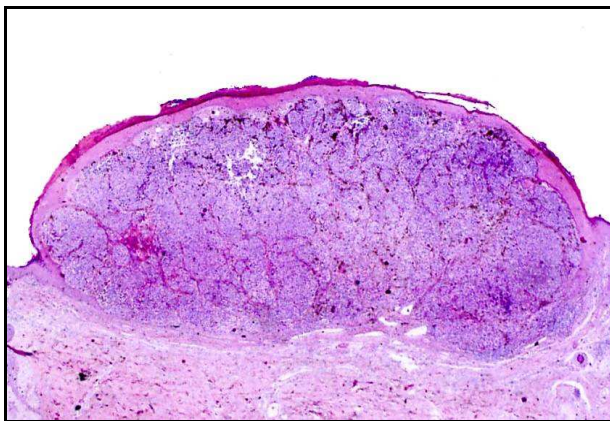


Fig I.6. Imagen histológica del melanoma nodular

- Melanoma lentiginoso acral (MLA): es particularmente frecuente en las razas negra y asiática (japoneses y taiwaneses), mientras que en la raza blanca representa menos del 5% de todos los melanomas. Su asociación a nevus displásicos y exposición solar crónica o quemaduras solares es menos frecuente que en otros tipos de melanomas, desconociéndose el papel de otros posibles agentes etiológicos. El melanoma subungueal se considera una variante del melanoma lentiginoso acral y hasta un 75% de las presentaciones son en el dedo pulgar de la mano y primer dedo del pie (125).

Se caracterizan por una fase de crecimiento radial en la que se observa una hiperplasia epidérmica con un patrón de distribución lentiginosa de los melanocitos atípicos, dispuestos en las capas más basales de la epidermis y que ocasionalmente forman nidos (**Figura I.7**). Estos melanocitos atípicos suelen estar hinchados y rodeados por un halo claro, adquiriendo un aspecto lacunar. El componente invasivo está compuesto básicamente por células fusiformes, observándose a veces una respuesta desmoplásica del estroma (1).

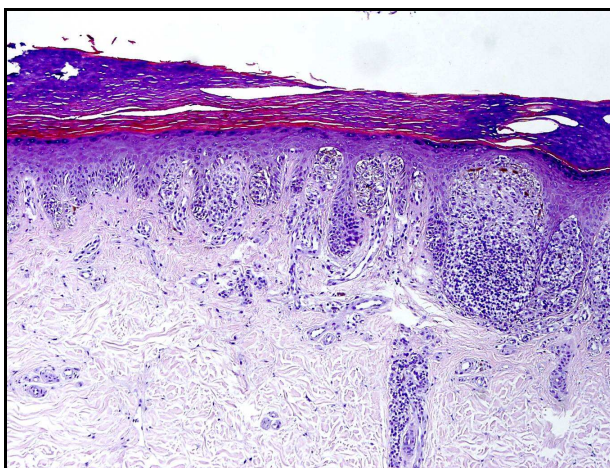


Fig I.7. Imagen histológica: melanoma lentiginoso acral

-El lentigo maligno melanoma (LLM) o lentigo de Hutchinson (133): Su lesión precursora, el léntigo maligno, es una mácula irregular, de crecimiento lento y pigmentación heterocrómica con frecuentes áreas acrómicas que corresponden a zonas de regresión, en la cara y en las

zonas expuestas. Presenta una fase de crecimiento radial larga (de 5 a 15 años, o incluso más) y cuando empieza la fase de crecimiento vertical, la lesión característicamente se engruesa convirtiéndose en placas sobreelevadas con pequeños nódulos. El riesgo de transformación de un lentigo maligno en un melanoma infiltrante es muy variable y, según las series oscila entre un 2,2% hasta un 30% (1, 134). Existe controversia en la literatura en cuanto a si considerar esta lesión precursora como una displasia melanocítica o como un verdadero melanoma in situ (135,136).

Histopatológicamente, el lentigo maligno melanoma se caracteriza por un componente epidérmico de melanocitos atípicos dispuestos de forma aislada y en pequeños nidos confinados a la capa basal de la epidermis y con discreta invasión pagetoide de la misma. Se suele asociar con atrofia epidérmica (**Figura I.8**). El componente invasivo puede estar compuesto por melanocitos epitelioides o fusiformes, con atipia citológica variable (1). Es frecuente la presencia de moderada o intensa elastosis solar en la dermis, aunque no es imprescindible para el diagnóstico (137). Una vez que se ha desarrollado la fase de crecimiento vertical, el pronóstico no es diferente al de los otros tipos de melanoma cutáneo y está condicionado por el espesor tumoral.

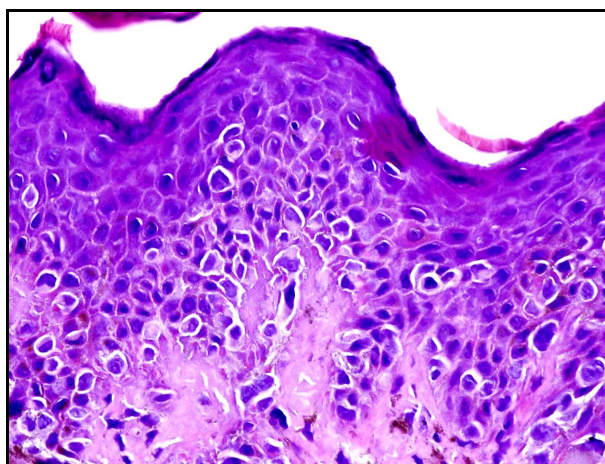


Fig I.8. Imagen histológica: lentigo maligno melanoma

-Formas menos frecuentes de melanoma

1. Melanoma de mucosas: los melanomas en mucosas pueden localizarse tanto en la mucosa ano-genital, oral o conjuntival. Suelen tener una fase de crecimiento radial o pagetoide semejante a la del melanoma de crecimiento superficial.

2. Melanoma desmoplásico: Es una variante clínico-patológica poco frecuente, que se presenta clínicamente como una lesión banal en la cara o cuello, que posteriormente desarrolla un tumor profundo, fibroso, con predominio de células fusiformes, caracterizado por una tendencia a las recidivas locales múltiples y con gran capacidad de infiltración local y escaso desarrollo de metástasis (138).

3.7. Pronóstico y estadificación

Como hemos mencionado anteriormente el melanoma tiene un comportamiento biológico característico con un crecimiento radial y vertical, y es en esta última fase de crecimiento cuando el melanoma tiene capacidad de producir metástasis. Dependiendo de la fase de crecimiento, así como de que la enfermedad sea local o presente ya afectación linfática o visceral, el pronóstico cambia de forma significativa. Es por ello necesario, que una vez que se diagnostica un melanoma, se proceda a su estadificación con fines pronósticos y terapéuticos.

La American Joint Cancer Comision (AJCC), utiliza un sistema de estadificación de los enfermos con melanoma basado en el estudio del TNM (**Tabla I.2**), que mediante la utilización de datos clínicos e histológicos tales como: espesor, presencia o no de ulceración, número de ganglios linfáticos afectos y las características de estos (micrometástasis o macrometástasis) y, la presencia o no de metástasis a distancia, permite clasificar a los pacientes con melanomas en diferentes estadios clínicos (**Tabla I.3**), dependiendo de que la enfermedad esté localizada (estadios I y II), con enfermedad ganglionar y regional (estadio III) o con metástasis a distancia (estadio IV). Este sistema de estadificación permite clasificar a los pacientes en subgrupos homogéneos facilitando su inclusión en ensayos clínicos y la comparación de resultados, y facilita la información pronóstica.

En la estadificación microscópica del tumor los hallazgos de mayor importancia pronóstica son el espesor tumoral y la ulceración. La invasión tumoral se establece utilizando dos sistemas: la medición milimétrica del grosor (índice de Breslow) y el nivel cutáneo de invasión (niveles de Clark) (139,140).

- Se distinguen 5 niveles de **invasión o niveles de Clark**: El nivel I corresponde a los tumores puramente epidérmicos; el nivel II indica que la tumoración atraviesa la unión dermo-epidérmica con invasión focal de la dermis papilar; el nivel III caracteriza a los tumores que ocupan toda la dermis papilar expandiéndola; el nivel IV indica que la tumoración infiltra la dermis reticular y el nivel V indica la invasión del tejido graso subcutáneo. El pronóstico empeora al aumentar el nivel, pero tiene menos valor que el espesor medido en milímetros o índice de Breslow.

-La medición del espesor tumoral en milímetros o índice de Breslow, es una variable independiente de otros factores, que determina el pronóstico (141). La AJCC, establece 4 categorías en tumores diagnosticados en estadio clínico I, basados únicamente en el espesor de Breslow al diagnóstico: $\leq 1.0\text{mm}$, 1.01-2.0mm, 2.01-4.0mm, y $>4.0\text{mm}$ (141). En base a estas categorías, se establecen tres grandes grupos pronósticos: hasta 1mm: buen pronóstico; entre 1 y 2mm: pronóstico intermedio; mayor de 2mm: mal pronóstico. Para los melanomas finos ($<1\text{mm}$), la supervivencia a los 5 años es mayor del 90%; en contraste, para los melanomas gruesos ($>4\text{mm}$ con ulceración) la supervivencia a los 5 años es de aproximadamente 45% (141).

Tabla I.2. Clasificación TNM del Melanoma

Clasificación T	Espesor	Ulceración
T1	≤1.0 mm	a: sin ulceración y nivel II/III b: con ulceración o nivel IV/V
T2	1.01-2.0 mm	a: sin ulceración b: con ulceración
T3	2.01-4.0 mm	a: sin ulceración b: con ulceración
Clasificación N	Nº de ganglios metastáticos	Tipo de afectación ganglionar
N1	1 ganglio	a: micrometástasis* b: macrometástasis**
N2	2-3 ganglios	a: micrometástasis* b: macrometástasis**
N3	4 o más ganglios metastáticos o metástasis en tránsito o satelitosis sin ganglios metastáticos	
Clasificación M	Localización	LDH sérica
M1a	Piel distante, subcutánea o metástasis linfática	Normal
M1b	Metástasis pulmonares	Normal
M1c	Otras metástasis viscerales Cualquier metástasis a distancia	Normal Elevada

*: micrometástasis se definen tras el estudio de la biopsia del ganglio centinela o de la linfadenectomía electiva.
 **: Macrometástasis se definen como las metástasis linfáticas clínicamente detectables y confirmadas mediante linfadenectomía terapéutica o cuando las metástasis linfáticas muestran afectación extracapsular microscópica.

Tabla I.3. Definición de los grupos de estadíaje del melanoma cutáneo

Estadíaje clínico*				Estadíaje patológico			
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Cualquier T	Cualquier N	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a/b	N2c	M0
				IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	Cualquier M	IV	Cualquier T	Cualquier N	Cualquier M

*El estadíaje clínico incluye el microestadíaje del melanoma primario y la valoración clínica y radiológica de la presencia de metástasis. Por acuerdo debe ser utilizada tras la extirpación completa del melanoma primario y el estudio clínico para la presencia de metástasis regionales y a distancia.
 **El estadíaje anatómo-patológico incluye el microestadíaje del melanoma primario y la información patológica de los ganglios linfáticos regionales tras la linfadenectomía parcial o completa. Los pacientes con el estadíaje patológico 0 o IA constituyen una excepción ya que no requieren estudio patológico de los ganglios linfáticos.
 De Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DB y col. Final version of the American Joint committee on Cancer Staging system for cutaneous melanoma. J Clin Oncol 2001; 19:3635-48 (150).

3.8. Evolución y tratamiento

El curso clínico del melanoma se caracteriza por su propensión a metastatizar. Las primeras en aparecer suelen ser las metástasis linfáticas, bien alrededor del tumor inicial (satelitis), en el trayecto entre el tumor primario y los ganglios regionales (metástasis en tránsito), o en los ganglios linfáticos regionales (metástasis ganglionares). Posteriormente aparecen metástasis generalizadas por vía hemática, con preferencia en los pulmones, hígado, cerebro, piel y huesos. Sin embargo, no es preciso que las metástasis sigan la pauta linfático-ganglionar-sistémica, pudiendo aparecer la primera manifestación metastásica la cerebral (142). Tras la escisión quirúrgica del tumor primario, las metástasis suelen aparecer en el 60-70% de los casos en los primeros 2 años, y en el 80% en los primeros tres años (142). Después del tratamiento del tumor primario, el melanoma puede metastatizar en la piel en un tercio de los pacientes, el patrón es impredecible y cualquier localización puede resultar afectada (142).

El tratamiento del melanoma incluye tres aspectos fundamentales:

1. Márgenes de resección: Estudios controlados demuestran que una cirugía con márgenes de resección arbitrarios no está justificada (143). Se recomienda exéresis amplia hasta fascia, con margen de seguridad de piel normal. Aunque hay discusiones entre autores que propugnan mayor o menor agresividad (144-146), la pauta más aceptada y la que se sigue en Hospital 12 de Octubre es la siguiente (147): 1º. *In situ*: 0,5 cm de margen; 2º. Espesor de Breslow de hasta 1mm: 1cm de margen; 3º. Espesor de Breslow de más de 1mm: 2cm de margen, si se puede. Estos márgenes no son adecuados en algunas lesiones en la cara, por razones estéticas (147).

2. Ampliación quirúrgica: Se ha demostrado que en ausencia de lesión macroscópica, hallar lesión residual en una ampliación quirúrgica de un melanoma completamente extirpado es excepcional (145). No obstante, se recomienda ampliar la extirpación hasta cumplir con los mm/cm estipulados en el apartado 1.

3. Biopsia del ganglio centinela: Los protocolos quirúrgicos actuales están de acuerdo en que las adenopatías clínicamente palpables deben ser extirpadas, realizándose en estos casos la linfadenectomía terapéutica de la región afectada (147).

Por otra parte, la mayoría de los pacientes (90%) con melanoma y sin signos de metástasis en ganglios regionales (no palpables), se clasifican dentro del estadio I de la enfermedad. Cuando estos pacientes se subdividen según el espesor de Breslow, existe un subgrupo (0,76-4,00 mm) en el que el 12-35%, presentará micrometástasis en el momento de la resección primaria (148). Es por ello que se ideó la detección del ganglio centinela. En aquellos casos en los que el ganglio centinela es positivo, se procede a linfadenectomía radical del paquete ganglionar afecto, pues se trata ya de un estadio III de la AJCC. Según algunos autores una biopsia de ganglio centinela positiva es el factor con más riesgo para desarrollar una metástasis, sin embargo no está demostrado que la presencia de una biopsia de ganglio centinela negativa excluya o disminuya la posibilidad de desarrollar una metástasis (146).

En los últimos tiempos, están apareciendo nuevos fármacos que parecen ser más efectivos en la enfermedad metastásica, como por ejemplo el interferón (148). En cualquier caso, todavía no estamos en posesión de ningún tratamiento realmente eficaz para los pacientes con melanoma metastático. Así, en el tratamiento de las metástasis regionales, lo ideal es la extirpación de las metástasis en tránsito o linfadenectomía de los lechos ganglionares afectos si se puede. En el tratamiento del melanoma metastático, la cirugía es paliativa y debe hacerse en caso de metástasis única o que pueda poner en peligro inmediato la vida del paciente (obstrucción intestinal, hemorragia, etc.). La radioterapia es útil para metástasis cerebrales, compresión medular, metástasis óseas dolorosas o para disminuir el tamaño de metástasis cutáneas (149). En el melanoma metastático, la quimioterapia es el tratamiento de elección. Las remisiones completas son raras y de muy corta duración.

4. Carcinogénesis en el melanoma

4.1. La carcinogénesis vs. enfermedad del ciclo celular

La capacidad de un agente de producir una neoplasia se denomina carcinogénesis. En el proceso de transformación progresiva de las células normales en células malignas, las señales químicas, físicas y biológicas, en una o varias fases del ciclo celular provocan modificaciones moleculares y estructurales que alteran el proceso vital de la célula (151,152).

La *teoría clásica* de la carcinogénesis sugiere que la acumulación de mutaciones genéticas es responsable de la oncogénesis. Sin embargo, estos modelos no explican como carcinógenos no-mutagénicos producen enfermedad y agregan mutaciones genéticas, inicialmente insuficientes para causar cáncer; lo que da lugar a la *teoría de la inestabilidad genética* (153) que propone que las células preneoplásicas son las que sufren un desequilibrio genético y no las células normales, con el resultado de mutaciones genéticas y epigenéticas acumulativas (153). El resultado consiste en la activación de genes, que estimulan la proliferación o la protección contra la muerte celular (oncogenes) y la inactivación de genes que normalmente actuarían inhibiendo la proliferación (genes supresores de tumor). Finalmente, una vez superados los controles de proliferación y muerte celular, el proceso de malignidad de la célula se "fija" cuando ésta es capaz de immortalizarse y de obtener suficiente cantidad de oxígeno y nutrientes para mantener su elevado nivel de proliferación. La célula maligna formará una nueva población de células genéticamente diferentes a la original, constituyendo el tumor (154,155).

4.2. Modelo de progresión tumoral en el melanoma

Clark y Elder (121), establecieron en 1984 un modelo de carcinogénesis o progresión

tumoral por etapas en el melanoma a través de lesiones clínicas fácilmente reconocibles. Dicho modelo es sólo conceptual, y no indica en absoluto que una lesión melánica vaya a seguir las diferentes etapas de progresión, ya que muchas de ellas comienzan de novo como benignas o malignas (**Figura I.9**) (156):

1. La primera y la más común de las lesiones melánicas es una proliferación focal en la base de la epidermis de los melanocitos normales. Clínicamente, se observa una lesión redondeada y pigmentada: **nevus melanocítico adquirido común**. La gran mayoría de estos nevus maduran en profundidad lipomizándose, o bien neurotizándose (“diferenciación schwanniana”) (121).
2. En algunos pacientes, que no siguen la evolución descrita, se observa crecimiento periférico intraepidérmico de los melanocitos persistente, con diferenciación aberrante: **nevus melanocítico con hiperplasia melanocítica lentiginosa**. Si posteriormente, en la zona de dicha diferenciación aberrante, aparecen melanocitos atípicos de gran tamaño, con núcleos hipercromáticos y citoplasmas amplios, se origina un **nevus displásico**.
3. Posteriormente, estas lesiones pueden evolucionar a un melanoma en **fase de crecimiento radial**, que durante meses o años, esté limitado a la epidermis con extensión pagetoide en los diferentes estratos de la epidermis, pero sin capacidad de producir metástasis. Más tarde, la lesión puede invadir la dermis papilar en forma de pequeños nidos, sin capacidad metastásica.
4. En la **fase de crecimiento vertical**, la tumoración invade la dermis con la capacidad de producir metástasis linfáticas o sanguíneas.
5. Fase de **melanoma metastático**, en la que las células melánicas malignas se desplazan por el torrente sanguíneo o linfático a estructuras viscerales alejadas.

Aunque es bien conocido que los melanomas cutáneos surgen a partir de melanocitos de la epidermis en ausencia de lesiones precursoras reconocibles (157), la correlación observada a partir de los estudios clínicos e histológicos argumentan a favor del concepto de progresión tumoral propuesto. La evolución observada refleja un proceso dinámico que implica una serie de alteraciones moleculares secuenciales inducidas por el influjo de todos los factores de riesgo etiológicos citados previamente. El estado de lesión precursora es un estado de susceptibilidad al desarrollo de una lesión que puede transformarse en cáncer (157).

Estos datos apoyan el modelo evolutivo de Clark para la tumorigénesis del melanoma, y el concepto de que algunos NMD están histogenéticamente relacionados o representan una fase transicional en el desarrollo del melanoma. Durante las dos últimas décadas se ha observado un aumento importante de los trabajos experimentales, que apoyan solidamente esta teoría, tanto en melanoma como en otros tipos de tumores, como en el carcinoma colorrectal a partir de adenomas benignos (158,159).

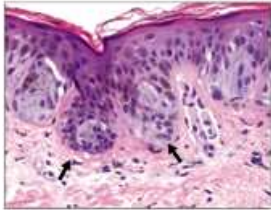
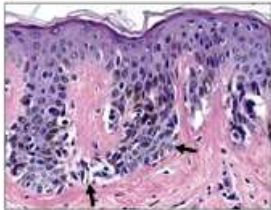
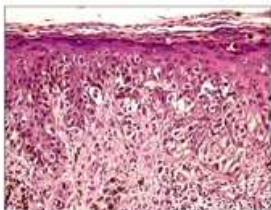
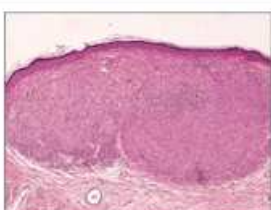
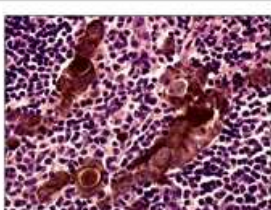
Histopathological Appearance	Description	Histologic Features
 <p>Benign nevus</p>	<p>1.</p> <p>Proliferación de melanocitos estructuralmente normales: nevus melanocítico benigno. Histológicamente estas lesiones muestran un incremento de tecas de melanocitos a lo largo de la capa basal de la epidermis.</p>	<p>Proliferación de melanocitos Lesiones benignas</p>
 <p>Dysplastic nevi</p>	<p>2.</p> <p>Desarrollo de un crecimiento aberrante. Esto puede ocurrir en una lesión preexistente o de novo. Histológicamente, estas lesiones presentan atipia citológica de forma aleatoria y discontinua</p>	<p>Displasia celular Atipia aleatoria</p>
 <p>Radial-growth phase</p>	<p>3.</p> <p>En la fase de crecimiento radial, las células proliferan intraepidérmicamente. Estas lesiones muestran histológicamente una morfología cancerosa a lo largo de la neoplasia. Las células pueden invadir la dermis papilar de forma aislada o en pequeños nidos.</p>	<p>Crecimiento intraepidérmico Atipia confluyente</p>
 <p>Vertical-growth phase</p>	<p>4.</p> <p>Las lesiones que progresan hacia la fase de crecimiento vertical invaden la dermis y forman un tumor expansivo que expande la dermis papilar. Las células pueden invadir la dermis reticular y el tejido celular subcutáneo.</p>	<p>Invasión dérmica</p>
 <p>Metastatic melanoma</p>	<p>5.</p> <p>Las células tumorales se diseminan a otras localizaciones, en la piel y hacia otros órganos, donde proliferan y establecen un foco de metástasis.</p>	<p>Metástasis</p>

Fig I.9. Modelo de progresión tumoral de Clark (H&E): los melanocitos progresan a través de una serie de pasos hacia su transformación maligna. Las características histológicas de cada momento en la evolución son las manifestaciones visibles de los cambios genéticos subyacentes. Miller & Mihm. N Engl J Med, 2006 (156).

De acuerdo con la hipótesis de *Clark* (121), basada en observaciones histopatológicas, múltiples estudios experimentales han aislado y cultivado células en diferentes estadios de progresión, que muestran un desarrollo escalonado de las mismas hacia un fenotipo maligno definido por parámetros biológicos: 1. Vida media celular en cultivo (limitada para melanocitos normales y nevus benignos, frente al crecimiento infinito de las células del melanoma); 2. Autonomía del crecimiento celular, independiente de los factores de crecimiento exógenos y otros agentes mitógenos; 3. Expresión de antígenos asociados al melanoma; 4. Anormalidades cromosómicas (cariotipo diploide) (160-162).

En los años 80 y 90 el paradigma genético domina la investigación sobre el cáncer y las revisiones al respecto son múltiples (124,163-165). Con el reciente progreso en los estudios de genética molecular sobre el cáncer, se establece que la carcinogénesis y la progresión tumoral están causadas por acumulaciones de múltiples alteraciones cromosómicas y mutaciones en protooncogenes y genes supresores (166), y que en el melanoma, hay una acumulación progresiva de anormalidades del ADN que generan una mayor inestabilidad genética, que finalmente, conduce a la transformación maligna (**Figura I.10**) (167,168).

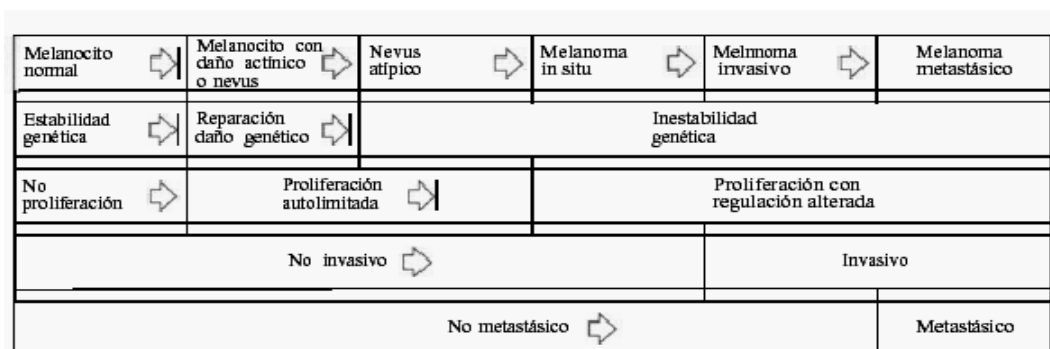


Fig I.10. Modelo de la progresión molecular y biológica en el melanoma. *Puig L, Act Dermatolog 1997 (122).*

Cuando el clínico se encuentra ante un tumor, no observa más que un pequeño momento de la vida del proceso canceroso, el denominado periodo clínico. Este periodo puede ser asimilado a lo que representa la parte visible de un iceberg, que mantiene fuera de nuestra vista el periodo más largo, el que va desde la actuación de la causa hasta la emergencia clínica y que encierra el periodo precanceroso (iniciación, promoción y una parte más o menos importante de la progresión) (120,155).

5. Perfil genético-molecular de las lesiones melanocíticas

Las características fundamentales del melanoma que se derivan de su progresión tumoral son: su relación con nevus con alteraciones arquitecturales y atipia citológica (nevus

atípicos o “displásicos”), el aumento de la proliferación de los melanocitos dentro de la epidermis, y la asunción por parte del tumor de la competencia para invadir la dermis, proliferar en ella y desarrollar capacidad metastásica.

Los cambios histológicos progresivos que se asocian a la progresión tumoral desde los melanocitos normales hasta el melanoma descritos por Clark (121), implican una concatenación compleja de alteraciones moleculares en una subpoblación o clon celular, que se producen por mutaciones genéticas (156). Estas alteraciones se producen fundamentalmente en dos tipos de genes: genes supresores tumorales (169) cuyas funciones son suprimidas o alteradas, y oncogenes (170) cuyas funciones son activadas, aumentadas o modificadas.

Muchos estudios sobre lesiones melanocíticas benignas, malignas y líneas celulares de melanomas, llevados a cabo a lo largo de varias décadas, han permitido definir y validar la existencia de numerosos genes implicados en el desarrollo y la progresión del melanoma (171).

5.1. Genes de susceptibilidad en el melanoma

La inducción de una inestabilidad genética mantenida dentro del genoma del melanocito representa un acontecimiento crítico para el desarrollo del melanoma y es la primera fase de la progresión molecular en el melanoma.

Los síndromes familiares frecuentemente han sido de gran ayuda para esclarecer las lesiones genéticas responsables tanto de enfermedades familiares como de enfermedades esporádicas. Los casos de “melanomas heredo-familiares” representan aproximadamente el 8-12% de todos los casos de melanomas (172), y un excelente ejemplo. Estudios de linajes entre las familias afectadas llevaron a la identificación de genes de susceptibilidad al melanoma como *CDKN2A* (173,174) y *CDK4* (175), cuyos productos participan en vías de progresión tumoral (176-178). Por otra parte, recientemente se ha observado una predisposición asociada a pigmentación que deriva de la asociación del melanoma al receptor de melanocortina-1 (*MC1R*) polimorfo (fenotipo pelirrojo, de piel clara, sensibilidad solar con abundantes pecas).

5.1.1. Gen *CDKN2A*

El gen *CDKN2A* se localiza en el locus 9p21. Este locus tiene una organización inusual y compleja, que codifica para dos proteínas supresoras de tumores diferentes: *INK4A* (conocida también como *p16*) y para *ARF* (conocida también como *p14* o *p19* en ratones) (178,179) (**Figura I.11.a**). Existen abundantes evidencias que implican a 1 o más genes supresores tumorales localizados en la región p21 del cromosoma 9 en las fases precoces del desarrollo del melanoma tanto esporádico como familiar (180-182).

La proteína *INK4A* (de la familia de los inhibidores de las quinasa dependientes de ciclinas), inhibe *CDK4/6*, la quinasa dependiente de las ciclinas 4 y 6. En ausencia de *INK4A*, el complejo *CDK4/6*-ciclina D fosforila Rb, y libera al factor de transcripción EF2. EF2 activa

genes diana necesarios para la progresión del ciclo celular hacia la fase S. Cuando la proteína INK4A se une a CDK4/6, se suprime la transición G₁/S (183), mediante la inhibición de la hiperfosforilación de Rb (**Figura I.11.b**). Las células tumorales utilizan diversos mecanismos para inactivar las funciones de p16 tales como delección, mutación, o metilación del gen y amplificación o mutación de los genes CDK4 o CDK6, o bien mutaciones del gen RB. La pérdida precoz de la vía de inhibición del ciclo celular relacionada con p16 (173,174) puede dar lugar a un aumento neto en la proliferación de los melanocitos que a su vez aumenta la probabilidad de que se acumulen daños genéticos adicionales durante la división celular normal o inducida por radiación ultravioleta.

La presencia de mutaciones en líneas germinales en individuos con melanomas “heredo-familiares”, particularmente aquellas que afectan específicamente al exón 1α, que codifica exclusivamente para INK4a es importante en la supresión génica en melanomas. La incidencia de mutaciones de CDKN2A en melanomas “familiares” alcanza el 25-40%, y sólo el 0.2-2% en pacientes con melanomas esporádicos.

Se ha descrito que la expresión de p16 es inversamente proporcional al grado de agresividad del melanoma, es decir, a menor expresión de p16, mayor agresividad (173,179). También es cierto que se ha descrito esta mutación en melanocitos normales y en nevus sin signos clínicos ni histológicos de atipia celular, sin que se haya llegado a ninguna conclusión (183). Existen distintos estudios que demuestran alteraciones en otros genes, pero siempre íntimamente ligados a p16 (179). En base a estos estudios, p16 se perfila como uno de los posibles genes supresores con más importancia en el melanoma (179). Por otro lado, se calcula que en la población general, la mutación de p16 está presente en un 0,01%. La alteración del gen p16 parece tener una alta penetrancia y se transmite en muchas familias de forma autosómica dominante. Algunos autores sugieren una modificación en la penetrancia de p16 por los factores ambientales (184).

ARF (“*alternative reading frame*”, también llamada p14) es el producto alternativo del cuadro de lectura del locus que comparte con INK4A en 9p21 (177,178). El hecho de que una proporción significativa de casos familiares no posean mutaciones que afecten a la proteína INK4A, y de que las mutaciones de CDKN2A en melanomas afecten frecuentemente a INK4A y ARF sugiere que ARF pueda actuar como gen susceptible de melanoma. También, se han descrito mutaciones somáticas que afectan exclusivamente a la secuencia de codificación de ARF en melanomas humanos (185,186). Además, la inactivación de la vía de p53 está frecuentemente implicada en todas las células tumorales. Mientras que todos los tumores sólidos inactivan esta vía supresora a nivel del gen de p53 (TP53), el melanoma resulta una excepción. No se han observado mutaciones puntuales, ni pérdidas alélicas en especímenes procedentes de melanomas primarios o metastáticos (178). Recientemente, el establecimiento del papel de ARF como un regulador negativo de p53, ofrece una explicación al patrón de mutaciones genéticas en enfermedades humanas dónde no existe mutación directa del p53, y sin embargo existe una inactivación de la vía alternativa del ARF-MDM2-p53, vía delección del

9p21 (187,188).

En condiciones normales, ARF funciona como supresor tumoral deteniendo el ciclo celular o promoviendo la muerte celular cuando existe un daño en el ADN, o cuando varios oncogenes o la pérdida de Rb estimulan la proliferación celular aberrante. ARF participa en la regulación de los niveles de la proteína p53. Ejerce su acción a través de la proteína MDM2 (*“mouse double minute 2 protein”*), esta última provoca la ubiquitinación de p53, y su posterior degradación (189-191). ARF se une a mdm2, liberando así a p53, y permitiendo que esta detenga el ciclo celular en G2-M, y por tanto la reparación de DNA, o la inducción a la apoptosis (**Figura I. 11.c.**).

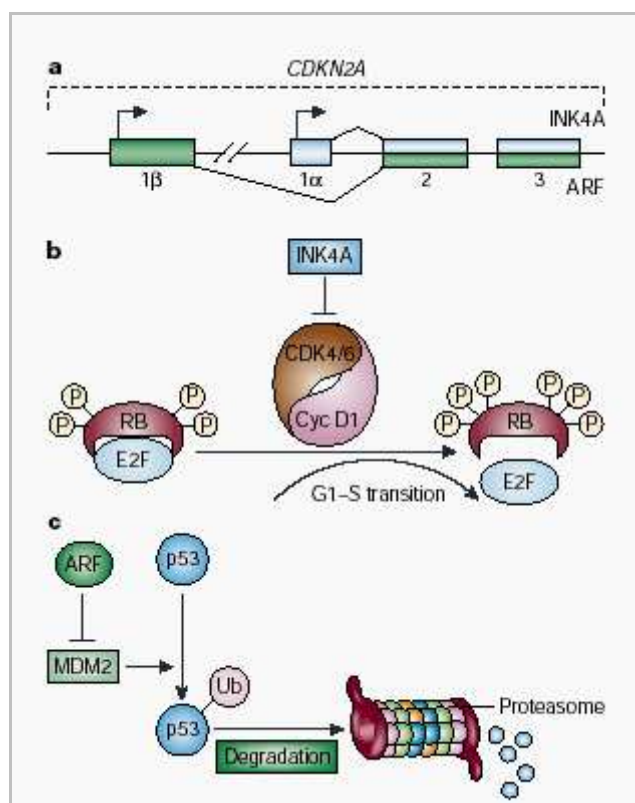


Fig I. 11. Locus 9p21. a). El locus 9p21 tiene una organización genómica inusual, está compuesto por 4 exones: 1α, 1β, 2, y 3. Este locus génico utilizando diferentes marcos de lectura solapados codifica dos transcritos diferentes a partir de diferentes promotores; cada uno de los transcritos tiene un exón específico en la posición 5', y sufren un empalme o *“splicing”* con los exones comunes 2 y 3. El transcrito iniciado en el exón 1α codifica INK4A. El segundo transcrito, se inicia en el exón 1β, codifica ARF; b). INK4A controla la transición G1-S regulada por RB. INK4A inhibe la hiperfosforilación de RB mediada por el complejo CDK4/6-ciclina D, y favorece la estabilidad del complejo formado con el factor de transcripción EF2, inhibiendo la transcripción de genes diana y deteniendo el ciclo celular en G1; c). ARF estabiliza los niveles de p53 bloqueando su degradación mediada por MDM-2 (mediante ubiquitinación). *Chin L. Nature Reviews Cancer, 2003 (178).*

5.1.2. Gen CDK4

La importancia de las mutaciones inactivadoras de INK4A en el melanoma se refuerza con la identificación de mutaciones en líneas germinales y somáticas de CDK4, en el cromosoma 17p13 (178). Se han identificado mutaciones puntuales (residuo de Arg): Arg24Cys o Arg24His (192) de CDK4 esporádicas o en células germinales con impacto clínico similar a las mutaciones de CDKN2A (INK4A) (193). La estructura cristalográfica del heterodímero INK4-

CDK6 revela que este residuo es crucial para la unión de INK4A a CDK6, y que la sustitución de dicho residuo impediría la asociación de las moléculas. Estudios experimentales en ratones, también demuestran que aquellos que contienen la mutación Arg24Cys en CDK4 son más susceptibles al melanoma tras el tratamiento con carcinógenos (194).

5.1.3. Gen localizado en el locus 1p22

Otro gen de alta penetrancia, localizado en 1p22 ha sido recientemente identificado como marcador de susceptibilidad para el desarrollo de melanoma (195).

5.1.4. Gen MCR1

MC1R (el receptor de la melanocortina 1), localizado en el extremo telomérico del cromosoma 16q24.3, constituye el único gen identificado que explica una parte sustancial de la variación fenotípica humana (196). Numerosos polimorfismos del gen *MC1R* se han aislado en la población mundial, sobre todo en raza caucásica. Ante tal diversidad, se estableció por consenso entre los resultados de varios grupos de trabajo cuál era la variedad o alelo más frecuente o *común* ("wild type"), que recientemente se ha secuenciado completamente y está presente en principio en la población asiática y africana (197). Se han descrito aproximadamente 30 variantes alélicas hasta ahora (197), de las que tres (Arg151Cys, Arg160-Trp, Asp294His) se asocian claramente con la presencia de pelo rojo, piel clara, ausencia de capacidad para broncearse correctamente y una gran predisposición para desarrollar lentigos solares (197,198). El conjunto de estas características, denominado fenotipo RHC (*red hair color*), constituye un factor de riesgo tanto para el melanoma como para el cáncer cutáneo no melanocítico, especialmente cuando se combina con factores de riesgo ambientales como la exposición de altas dosis de radiación UV. Estos fenotipos conllevan una menor capacidad de la epidermis para responder al daño causado por los rayos ultravioleta, y por lo tanto un mayor riesgo de melanoma (199). Además, la feomelanina produce metabolitos que se cree que son mutagénicos y citotóxicos, que podrían aumentar aún más este riesgo (200). Varios trabajos señalan que algunos de estos polimorfismos de *MC1R* otorgarían una mayor susceptibilidad para el desarrollo de melanoma esporádico y cáncer cutáneo no melanoma de forma independiente a la presencia del fenotipo RHC (197), y que, las variantes de *MC1R* modifican marcadamente la penetrancia de las mutaciones que se producen en el locus de *CDKN2A* (178,198).

Otra alteración descrita en los nevus displásicos no familiares es un aumento de la actividad de la telomerasa, actividad que no esta aumentada en los nevus normales. Esta actividad de la telomerasa aumenta según la lesión avanza en su progresión a melanoma (201).

5.2. Mutaciones somáticas en el melanoma

A pesar de su importante papel en la susceptibilidad, las mutaciones en *CDKN2A* y *CDK4* en los melanomas representan tan sólo una proporción de los casos de melanomas

familiares y esporádicos, lo que sugiere que existen otros genes relacionados con el desarrollo y la progresión del melanoma (178).

5.2.1. Cascada de proteínas quinasas MAPK (“mitogen-activated protein kinase”)

La cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos es una de las vías más ubicuas de transducción de señales, y regula importantes procesos biológicos como la progresión del ciclo celular (**Figura I. 12**).

Tras la unión de los ligandos (factores de crecimiento a sus respectivos receptores tirosin-quinasas (RTK)), la dimerización del receptor desencadena su actividad tirosin-quinasa intrínseca, autofosforilando residuos de tirosina específicos de la porción intracelular de dichos receptores (156). Los receptores activan la *proteína RAS* mediante el reclutamiento de pequeñas proteínas adaptadoras citosólicas como Grb-2 que se asocian con Sos (factor intercambiador de nucleótidos guanina-Ras) y convierte la proteína RAS, de Ras-GDP inactivo a Ras-GTP activo. Una vez activada la proteína Ras, se inicia una cascada de señalización mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina en diferentes proteínas como Raf-1 (proteína RAF: c-RAF1, ARAF y BRAF). Aunque no se ha podido dilucidar muy bien el mecanismo por el que Raf-1 se activa, se ha sugerido que la fosforilación del residuo de Ser-259 es esencial para su activación. Al ser activada Raf-1 puede fosforilar quinasas específicas Mek1. Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) — Erk 1 y Erk 2— son serina/treonina quinasas que son activadas por fosforilación por Mek1 y Mek2 que culmina con la fosforilación de Erk, la cual se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes relacionados con crecimiento tales como c-fos y c-jun. Estos dos factores de transcripción forman heterodímeros dando lugar a un complejo llamado AP1 que se une al DNA mediante secuencias consenso. AP1 controla la proliferación regulando la expresión de ciclinas como D1 y de proteínas reguladoras como p53 e inhibidoras como p21, p19 y p16 (178,202).

Las mutaciones activadoras de los genes RAS han demostrado ser una importante vía de la señalización celular para la proliferación y transformación maligna de los tumores. Estas mutaciones se han observado en melanomas, con una consistente, aunque no muy alta incidencia: 10-15% (178, 187). En particular, las mutaciones del gen N-RAS (localizado en el cromosoma 1p13.2), se han relacionado con melanomas nodulares y la exposición solar (173, 203). Estudios recientes sostienen que el 56% de los nevus congénitos (204), el 33% de los melanomas primarios, y el 26% de los melanomas metastáticos (205) contienen mutaciones puntuales de N-RAS. Sin embargo, raramente se observan en nevus displásicos (203). En el caso de H-RAS, *Bastian y cols* (206) han descrito ganancias en el cromosoma 11p, donde se localiza este gen, ocasionalmente amplificado, y que el alelo H-RAS amplificado tiene también un punto de mutaciones oncogénico en el nevus de Spitz. Posteriormente, estudios experimentales en ratones y en melanomas humanos han establecido un papel importante de esta vía de señalización en la génesis del melanoma (178). No se han descrito mutaciones en K-RAS en lesiones melanocíticas (187).

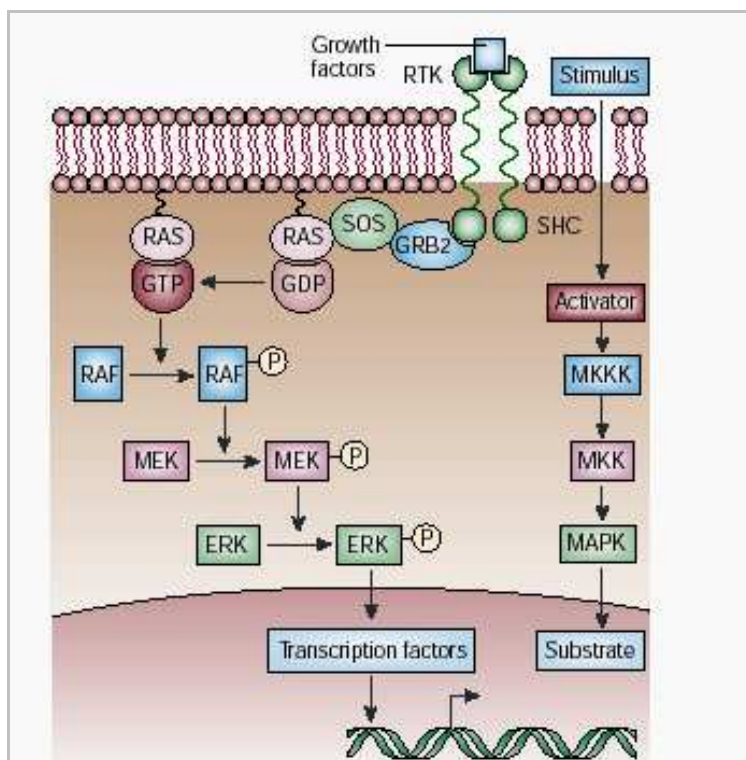


Fig I.12. Activación de la vía de señalización MAPK. La vía MAPK forma parte de un sistema de difusión que traduce una plétora de señales extracelulares en diversas respuestas celulares. La multiplicidad de sustratos en cada uno de los pasos secuenciales de las interacciones físicas confiere especificidad y amplifica las señales de la respuesta celular final. Este esquema representa una simplificación de uno de los módulos de señalización MAPK a través de la vía RAS-RAF-MEK-ERK. Chin L. *Nature Reviews Cancer*, 2003 (178).

Se han identificado también mutaciones en B-RAF (un potente activador de las proteínas quinasas Erk), el hecho genético más prevalente descrito en los melanomas hasta el momento. Estas mutaciones se han descrito en una variedad de tumores humanos, con la mayor incidencia en melanomas: de un 27% a un 70% (178,207,208). Por otra parte, recientemente, se han observado mutaciones de B-RAF en nevus adquiridos y nevus displásicos, lo que refuerza la observación de que la activación de ERKs es un hecho temprano en la progresión del melanoma, y la mutación de BRAF está involucrada en las fases tempranas del desarrollo de las neoplasias melanocíticas (209). El nevus de Spitz carece de esta mutación, y esta diferencia podría servir para distinguirlo del melanoma spitzoide (210).

También se ha demostrado que la mutación activadora de B-RAF (V600) (211), no es suficiente para la transformación maligna de los melanocitos (212).

5.2.2. Receptor de HGF (*factor de crecimiento hepatocitario*)

La proteína del receptor de HGF (*"hepatocyte growth factor"*), producto del proto-oncogen c-met (receptor tirosin-quinasa) se expresa en células epiteliales y en melanocitos (213). El HGF promueve una interacción paracrina mesenquimal-epitelial y también autocrina en células tumorales del melanoma (214). HGF estimula la proliferación y la motilidad de los melanocitos, y disminuye la adhesión entre los melanocitos y los queratinocitos de alrededor (alteración de la regulación de la cadherina E y de la desmogleina-1) (214).

La activación de HGF-cMET se ha implicado en la progresión del melanoma (215). Una expresión aumentada de cMET se ha observado en metástasis de melanoma, y parece que en estados tardíos de la progresión del melanoma se produce una ganancia del locus 7q33 donde

se localiza el c-MET (216). Sin embargo, aún no se ha identificado una amplificación focal de MET, ni una mutación puntual activadora en las células del melanoma (217).

5.2.3. El gen supresor PTEN

En un amplio espectro de tumores, que incluye un 30-50% de los melanomas humanos, se ha observado pérdida de heterocigosidad o reordenamiento en el cromosoma 10q24-26 (218). La delección afecta frecuentemente una amplia zona del locus y es capaz de eliminar varios genes supresores que incluyen *MXI1* (antagonista de MYC) y *PTEN*.

PTEN (conocido como gen supresor) es otro elemento importante entre las señales de transducción en los melanomas, codifica una fosfatasa, implicada en la vía que controla (regulador negativo) la apoptosis a través de la vía PI3K-AKT (219). Esta proteína regula las señales de crecimiento extracelulares que utilizan el lípido fosfatidil-inositol fosfato PIP3 como segundo mensajero intracelular. En presencia de señales de factores de crecimiento (p.e. integrinas y factores de crecimiento como el HGF, y el IGF-1) (220,221), los niveles intracelulares de PIP3 se elevan y fosforilan AKT, lo que favorece la progresión del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis. PTEN regula los niveles de PIP3, y su inactivación da lugar a la acumulación de PIP3, a la hiperfosforilación de AKT y favorece la supervivencia celular y la progresión del ciclo celular (**Figura I. 13**) (187).

Además, se ha observado que la expresión ectópica de PTEN en células de melanoma deficientes en PTEN es capaz de frenar la proliferación tumoral y las metástasis (222). Sin embargo, se ha observado que la mutación o pérdida alélica de PTEN se presenta sólo en 5 a 15% de las células de melanoma cultivadas (223), mientras que de 30-50% de los melanomas presentan pérdida de heterocigosidad de la región 10q, y la reintroducción de PTEN en dichas células no suprime el crecimiento tumoral (224), lo que sugiere que *MXI1* (antagonista de MYC) puede estar involucrado, aunque esto no está aún suficientemente estudiado (178).

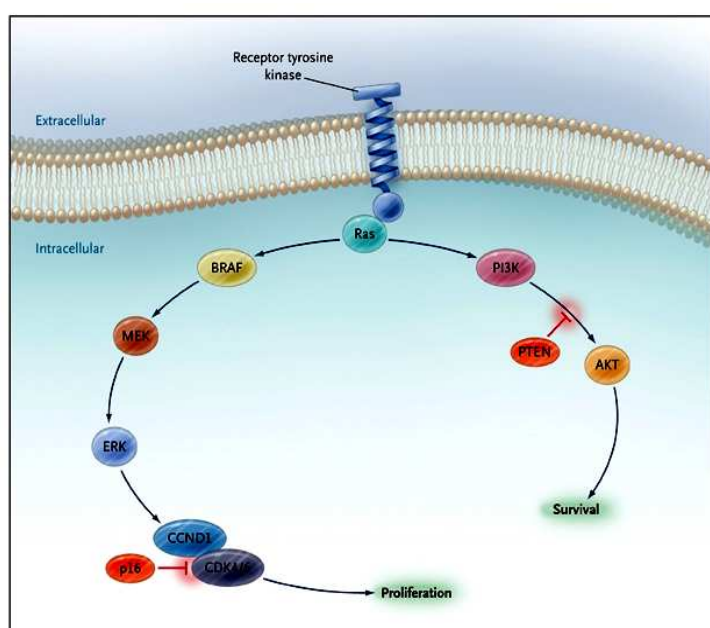


Fig I.13. Vías de señalización MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) y PI3K (quinasa fosfatidilinositol-3). Los ligandos de los receptores tirosin-quinasa pueden promover la proliferación celular a través de la vía MAPK (vía de la izquierda), o través de la vía PI3K (vía de la derecha). Curtin et al. *Engl J Med*, 2005 (224).

5.2.4. MITF ("*microphthalmia-associated transcription factor*") en el melanoma

Recientemente, la atención de muchos investigadores interesados en la biología de los melanocitos normales y de los melanomas, se ha centrado en un gen que parece coordinar casi todos los aspectos del comportamiento de los melanocitos. El gen MITF (asociado al cromosoma 3p) (225,226), es crítico tanto para la supervivencia de los melanoblastos, como para la coordinación de la expresión de varios genes como el de la tirosinasa, y Tyrp-1, etc, implicados en la síntesis de pigmento y de los melanosomas, por tanto en su diferenciación (227). Además, MITF es también necesario para la supervivencia de los melanocitos maduros (incrementando la expresión del factor anti-apoptótico Bcl-2) (228). Dado su papel crítico en la biología del melanocito, la expresión y la actividad de MITF está minuciosamente regulada genéticamente por una serie de al menos 9 promotores (pudiendo expresarse en diferentes isoformas), que a su vez están regulados por varios factores de transcripción (229). A nivel proteico, una serie de modificaciones pueden controlar su expresión o actividad (230).

La expresión de MITF está frecuentemente aumentada en el melanoma (231,232), lo que sugiere su papel pro-proliferativo (232). Actualmente, se han detectado amplificaciones del gen en melanomas (un aumento del número de copias: de 4 a 119), particularmente en melanomas metastásicos, y se ha establecido que MITF coopera con B-RAF en la transformación maligna de dichos melanocitos (función oncogénica) (226). Además, MITF está implicado en la regulación positiva de CDK2 (233), y que es un factor necesario en la acción proliferativa de la β -catenina en las células en cultivo de melanomas (234). Todos estos datos establecen el papel pro-proliferativo del factor MITF.

Paradójicamente, existen evidencias sólidas que establecen que MITF es un factor anti-proliferativo, por ejemplo, en melanocitos normales (231). Así, niveles elevados de MITF producen una parada del ciclo celular en G1, mediado por p21 y p16 (235), y la activación de B-RAF produce una fuerte supresión de la expresión de MITF (236). Lo más probable es que MITF tenga un papel doble, pro y anti-proliferativo dependiendo de sus niveles y de su grado de actividad. Por tanto, en el melanoma, el repertorio de las vías de señalización implicadas, mantendría los niveles de MITF adecuados para promover la proliferación, y simultáneamente, impedir que alcance los niveles de actividad que impidan la proliferación (230) (**Figura I.14**). Además, estos niveles serían variables en función de las señales microambientales, y establecerían una serie de fenotipos que variarían entre lesiones muy pigmentadas con células más diferenciadas y otras menos diferenciadas pero con un mayor índice de proliferación (230). Todos estos datos sugieren que MITF representa una clase diferente de oncogen ligado a la "supervivencia del linaje" ("*lineage survival*" o "*lineage addiction*" oncogenes), necesario para el desarrollo específico del tumor y su progresión (226).

Además, la amplificación de MITF se produce más frecuentemente en tumores con peor pronóstico, y se asocia también con resistencia a la quimioterapia (156,226).

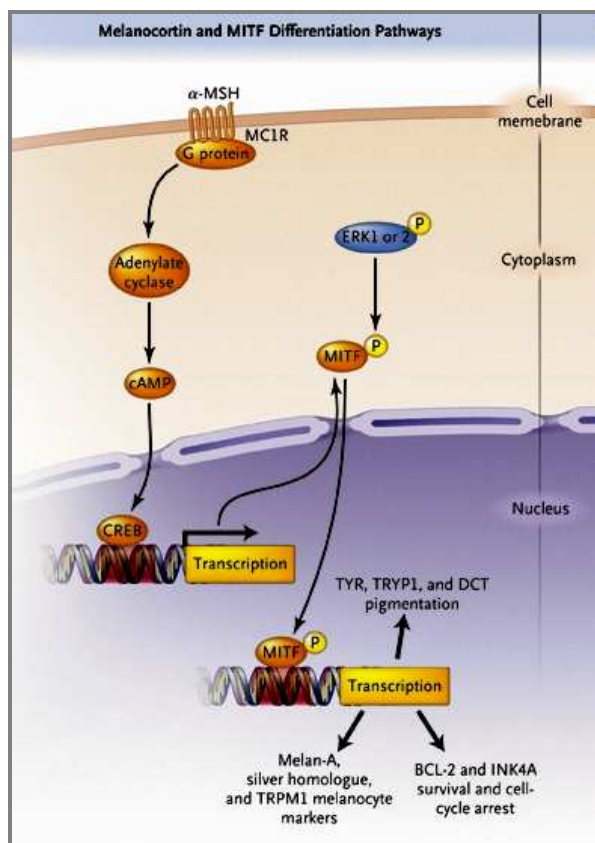


Fig I.14. Regulación de MITF. El factor de transcripción asociado a microftalmia está regulado a nivel transcripcional y post-translacional. La activación post-translacional está mediada por el componente ERK de la vía MAPK. La regulación más importante, se produce a nivel transcripcional, activada por señales extracelulares: melanocortina y la vía WNT. *Miller & Mihm. N Engl J Med, 2006 (156).*

5.3. Moléculas de adhesión e invasión

La adhesión celular, es capaz por sí misma de mantener la polaridad de las células y participar en el mantenimiento de las distintas organizaciones celulares denominadas tejidos (237). Esta capacidad de adhesión célula a célula, está generalmente disminuida en las neoplasias humanas, facilitando la pérdida de la correcta polaridad de las células, lo que da lugar a una destrucción de la arquitectura tisular, que a su vez es la marca característica del cáncer (238). La pérdida de la adhesión celular es indispensable para la invasión y metástasis en las distintas neoplasias humanas (238).

La invasión local y las metástasis son las responsables de la alta morbilidad y mortalidad de los melanomas (156). En el *modelo de Clark* (121), las características invasivas aparecen en la fase de crecimiento vertical; y el melanoma metastático se desarrolla cuando las células tumorales se disocian de la lesión primaria, migran a través del estroma subyacente, e invaden formaciones vasculares sanguíneas y linfáticas, dando lugar a una formación tumoral a distancia (237).

La alteración de la transición epitelio-mesénquima (TEM) es el proceso por el que la célula epitelial sufre cambios transitorios en su estructura y adquiere más motilidad con propiedades migratorias e invasivas (238). Las uniones intercelulares se alteran, las células pierden su polaridad habitual, expresan marcadores mesenquimales, y la actina del citoesqueleto se reorganiza. Como consecuencia, las células tumorales pierden el contacto con las vecinas, adquieren motilidad, e interactúan con la matriz extracelular, invadiendo los tejidos

adyacentes y adquiriendo capacidad para la metástasis (238,239). Estos cambios se asocian con la alteración de una serie de genes relacionados con TEM (239), y con la expresión de una serie de moléculas relacionadas (240).

Aunque las moléculas de adhesión son entre otros factores, las encargadas de mantener las uniones celulares, también participan en otros procesos biológicos de gran importancia como son la organogénesis, la homeostasis tisular, la remodelación de tejidos y la respuesta inflamatoria/inmune (241). Las alteraciones en la actividad de estas moléculas en las células neoplásicas producen no sólo la interrupción de las adhesiones célula a célula habituales y el desarrollo de nuevas interacciones celulares con el estroma, sino también, alteraciones en las interacciones con los factores de señalización de los tumores; hechos determinantes para el desarrollo de las metástasis (156, 242).

5.3.1. Cadherinas y catenina β

Las cadherinas son un grupo de moléculas de adhesión calcio-dependientes que juegan un papel importante en la adherencia célula-célula. Las cadherinas se conectan con la actina del citoesqueleto e influyen la señalización intracelular. Se dividen en tres subtipos: E (epitelial), presente en células polarizadas epiteliales de la epidermis (queratinocitos), así como melanocitos y células de Langerhans, P (placentaria), y N (neural) que en la piel humana se expresa en fibroblastos, y células endoteliales, pero no en melanocitos ni en queratinocitos (243).

La cadherina E es una proteína transmembranosa con un dominio extracelular y de membrana con el que se unen a glicoproteínas de superficie de las células vecinas, y un dominio citoplasmático que se asocia con una larga proteína compleja que incluye la catenina- β y forma enlaces estructurales con filamentos de actina del citoesqueleto. La cadherina E no sólo sirve de unión intercelular, también actúa como señal intracelular a través de la catenina β . Esta vía de señalización se conoce como la *vía WNT* ("*wingless-type mammary tumor virus integration-site family pathway*") y se activa o inhibe a través de la fosforilación de la catenina- β . A su vez, la catenina β es fundamental para una correcta expresión y funcionamiento de la cadherina-E (156).

Las proteínas de la vía WNT tienen importantes funciones en el desarrollo, en particular en las células derivadas de la cresta neural como los melanocitos. Cuando dichas proteínas se unen a su receptor, inactivan la proteína quinasa GSK3 β , una enzima que fosforila la catenina β , y provoca su degradación (244). Mientras que, la activación de la catenina β deshace su asociación con la cadherina E (245), y le permite translocarse al núcleo, lo que favorece la expresión de algunos genes (246). Mutaciones en el gen de catenina β puede estabilizar la proteína o incrementarla en su localización nuclear. Niveles elevados de catenina β en el núcleo incrementan la expresión de MITF y de CCND1, que a su vez incrementan la supervivencia y la proliferación de las células del melanoma (**Figura I.15**) (247).

Se ha descrito que el gen de la catenina β se encuentra mutado en el 5-25% de los melanomas (248,249). Según los últimos estudios sobre líneas y cultivos celulares, la expresión de catenina- β está relacionada con la progresión del melanoma (250,251). De hecho, los patrones de expresión son diferentes entre los nevus melanocíticos y los melanomas (251); la expresión nuclear es menor en los melanomas que en los nevus. Aunque, el papel de las cateninas- β en la progresión de los melanomas está todavía por aclarar.

Alteraciones en la expresión de las cadherinas afectan a la interacción de las células del melanoma con el entorno, y la vía de señalización de la catenina β . La expresión de cadherina E en las células de la epidermis permite la unión de los melanocitos y los queratinocitos (252). En cambio, el contacto con los queratinocitos indiferenciados de la capa basal de la epidermis inhibe la proliferación de los melanocitos y los transforma en melanocitos dendríticos (253). Se ha observado que la progresión en el melanoma de la fase de crecimiento radial a la fase de crecimiento vertical se caracteriza por la pérdida de cadherina E, y la expresión de cadherina N (239, 254). La cadherina N es característica de los tumores invasivos y facilita la diseminación metastásica, permitiendo a las células melánicas interactuar con otras células que expresan la cadherina N como los fibroblastos de la dermis y las células endoteliales. Además de estos cambios, la disminución de la expresión de cadherina E (255) y el aumento en la expresión de cadherina N aumenta la supervivencia de las células melanocíticas a través de la estimulación de la vía de la catenina β (256).

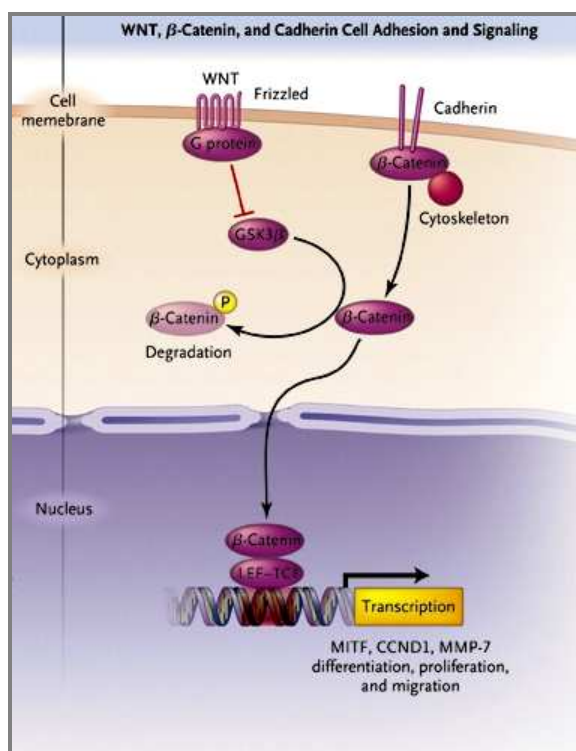


Fig I.15. Vía de señalización mediada por catenina- β : que juega un papel central en la adhesión y señalización celular. *Miller & Mihm. N Engl J Med, 2006 (156).*

5.3.2. Integrinas

Las integrinas son una superfamilia de glicoproteínas que participan fundamentalmente

en la unión de las células con la matriz extracelular, aunque algunas de ellas participan también en la unión célula-célula. Fundamentalmente son receptores de membrana, algunos reconocen fibronectina, laminina y colágeno que son componentes mayoritarios de la matriz (252).

La transición de la fase de crecimiento radial a la fase de crecimiento vertical se asocia con una hiperexpresión de la integrina $\alpha V\beta 3$ (239). Esta integrina induce la expresión de algunos de los componentes de la familia de *proteínas MMP* ("*matrix metalloproteinases*"), involucrados en la desintegración de la matriz extracelular en procesos fisiológicos, y en la invasión y metástasis tumorales. La MMP2 (que degrada el colágeno IV) (257), y ADAM9 (desintegrina y metaloproteinasa dominio 9) se asocian con la progresión de los melanocitos (239). Además, dicha integrina, incrementa la expresión del gen BCL2 (258) y estimula la motilidad de las células melánicas (mediante la reorganización del citoesqueleto) (259).

5.3.3. Osteonectina

La osteonectina (SPARC o BM40) es una glicoproteína segregada de la matriz extracelular, involucrada en la migración de las células tumorales, invasión y en la angiogénesis (260). La sobreexpresión de SPARC se ha asociado con una mayor agresividad del melanoma en varios estudios (239, 261).

5.3.4. Osteopontina

La osteopontina es una fosfoproteína segregada con un papel crucial en la progresión y el desarrollo de metástasis de varios tipos de tumores entre los que se incluye el melanoma (262). Dicha proteína favorece señales antiapoptóticas, la angiogénesis, e induce MMP.

La expresión de osteopontina se debe adquirir en estadios precoces de la invasión del melanoma, con niveles moderados-altos en melanomas invasivos primarios y metastáticos, y niveles nulos o muy bajos en nevus benignos, nevus displásicos y melanomas *in situ* (262).

5.4. Heterogeneidad genómica del melanoma

La identificación de esta serie de alteraciones genéticas que caracterizan el desarrollo y la progresión del melanoma ha sido un gran avance en el conocimiento del desarrollo del melanoma. Sin embargo, más allá de las alteraciones moleculares caracterizadas en estos estudios, el perfil genómico del melanoma revela una gran variabilidad (187). La heterogeneidad en la genómica del melanoma se ha convertido así en una importante área de investigación puesto que se asume que en ella están las claves de la patogenia de la enfermedad, de su comportamiento biológico, y de su posible escasa al tratamiento (263).

Las nuevas tecnologías de genómica de alta resolución, revelan la existencia de múltiples eventos génicos recurrentes y no aleatorios que gobiernan el desarrollo de melanomas (187,216,224,226). Estos estudios muestran que la evolución del melanoma depende de reordenamientos cromosómicos variables recurrentes y no-aleatorios, en particular

amplificaciones/ganancias y deleciones/pérdidas particularmente en los cromosomas 1, 6, 7, 9, 10 y 11, con dianas génicas no muy claras todavía en la mayoría de los casos (216). Así, *Bastian y cols.* analizan los cambios génicos (mediante *CGH hibridación genómica comparada*) en 32 melanomas primarios y mapean regiones génicas con número de copias aberrantes de secuencias de ADN (216) (**Figura I.16**).

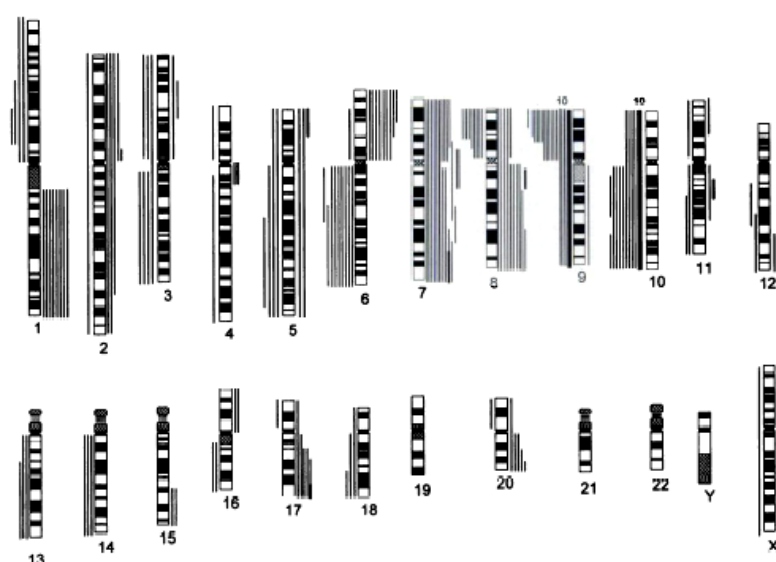


Fig I.16. Localización cromosómica de los cambios en el número de copias de las secuencias de ADN en 32 casos de melanomas primarios. Las líneas a la derecha de los cromosomas representan ganancias del número de copias; las líneas a la izquierda de los cromosomas representan pérdidas del número de copias. Las líneas engrosadas (negrita) representan amplificaciones. Las líneas engrosadas a la izquierda de los cromosomas 9 y 10 representan 10 casos con pérdida total de los cromosomas 9 o 10. *Bastian et al. Cancer Res, 1998 (216).*

En un análisis genómico sistemático que incluye 120 lesiones melanocíticas (32 líneas celulares de melanomas, 10 nevus melanocíticos benignos y 78 melanomas primarios y metastásicos), con array-CGH, *Chin y cols.* (187) revelan un nivel de complejidad genómica que no se había apreciado hasta el momento (**Figura I.17**). En total, aprecian hasta 435 alteraciones en el número de copias (ANCs) en las lesiones metastásicas que incluyen las alteraciones previamente descritas (p.e. ganancias 1q, ganancia 6p/pérdida 6q, ganancia 7, pérdida 9p, y pérdida 10). No resulta sorprendente que el grado de inestabilidad génica sea claramente mayor en las lesiones metastásicas que en los melanomas primarios y los nevus. Este tipo de análisis permite establecer una progresión en los eventos génicos que se traduce en el comportamiento biológico de la lesiones y que finalmente conduce hacia la metástasis.

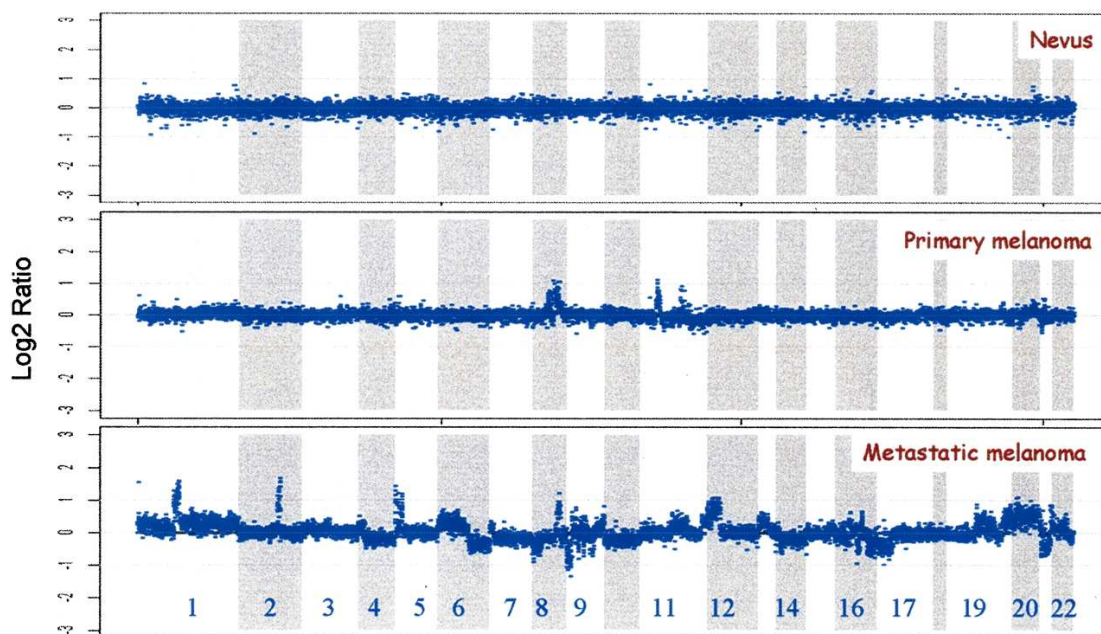


Fig I. 17: Alteraciones genómicas en lesiones melanocíticas benignas y malignas. Perfiles genómicos de lesiones correspondientes a nevus benignos, melanoma primario y metástasis de melanomas, que muestran un incremento en la complejidad de los mismos. Chin L et al. *Genes Dev*, 2006 (187).

Estos autores también observan que la heterogeneidad molecular de los melanomas, es diferente dependiendo de factores clínicos como las distintas localizaciones anatómicas, lo que induce comportamientos biológicos y clínicos marcadamente diferentes. Así, el lentigo maligno, un tumor indolente que se desarrolla a lo largo de varias décadas, en áreas crónicamente expuestas al sol, como la cara, presenta menos ganancias y pérdidas genómicas que el melanoma lentiginoso acral, que se desarrolla en regiones no-expuestas, y tiende a ser más agresivo (224, 263).

Curtin y cols. (224) muestran en su estudio (mediante array-CGH) que los múltiples cambios en el número de copias de ADN permiten dividir a los melanomas en 4 subtipos con distintos comportamientos clínicos y posibles respuestas terapéuticas: melanomas acrales, melanomas de mucosas, melanomas desarrollados sobre piel con daño crónico solar, y melanomas desarrollados sobre piel expuesta intermitentemente al sol pero sin daño crónico solar. Estas diferencias son especialmente llamativas entre los melanomas que se desarrollan en piel relativamente o absolutamente protegida del sol (melanomas acrales y de las mucosas), y melanomas que se desarrollan en piel con cierto grado de exposición solar. Específicamente, los melanomas acrales o de las mucosas tienen un mayor grado de aberraciones cromosómicas con abundantes ganancias o pérdidas de ADN ($p=0.004$), mayor número de alteraciones cromosómicas ($p<0.001$) y cambios en el número de amplicones ($p<0.001$) (**Figuras I.18 y I.19**). Únicamente en base a los cambios en el número de copias de ADN, las muestras pueden ser clasificadas en 4 grupos con una precisión del 70%. Si los grupos de melanomas se reducen a dos, los melanomas acrales y de mucosas serían correctamente clasificados en el 89% y el grupo de los melanomas que incluiría aquellos que se desarrollan sobre piel con y sin daño solar crónico serían correctamente clasificados en un 84%.

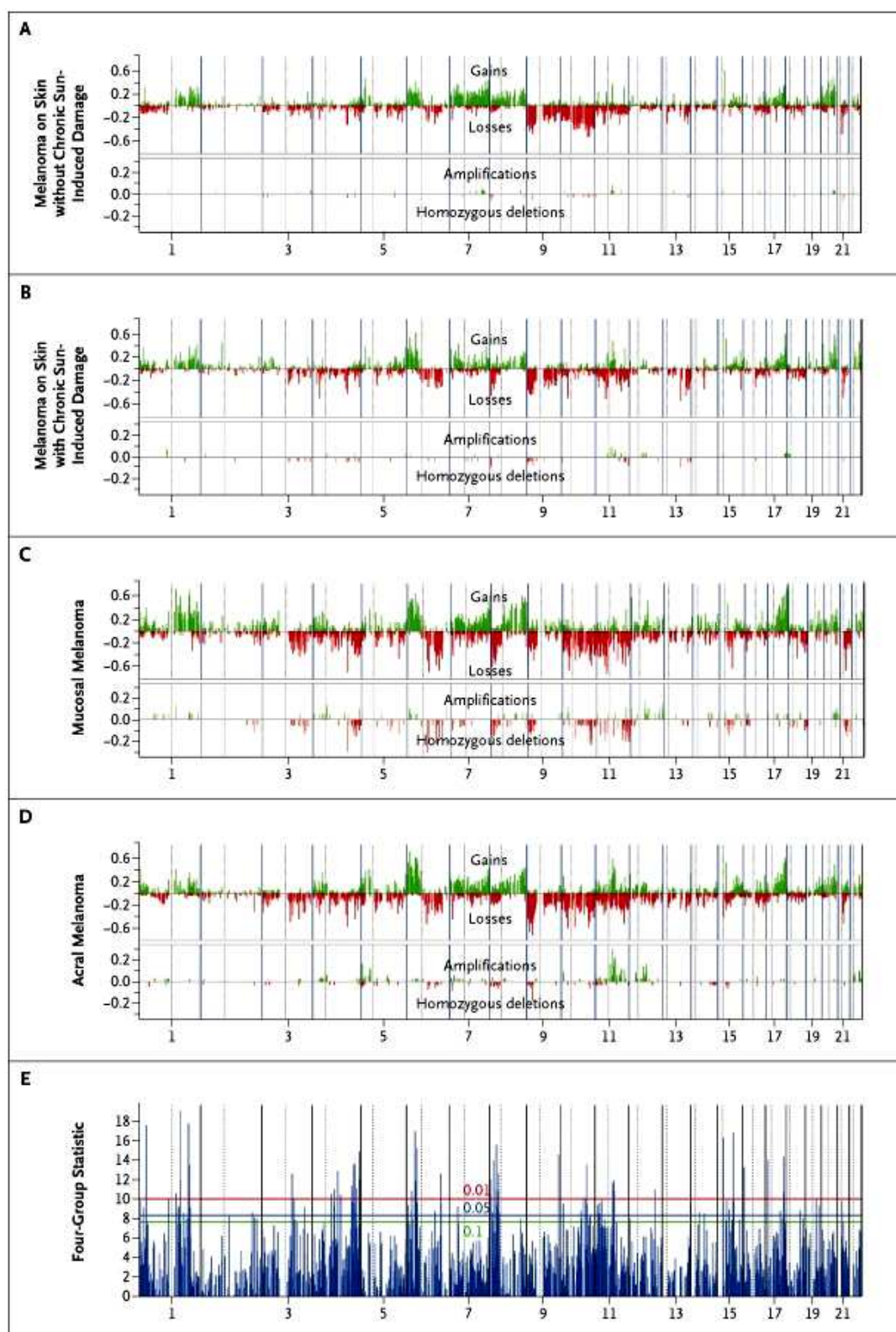


Fig I.18. Alteraciones genómicas frecuentes y regiones génicas diferencialmente afectadas en cada grupo de melanomas. Curtin et al. *N Engl J Med*, 2005 (224).

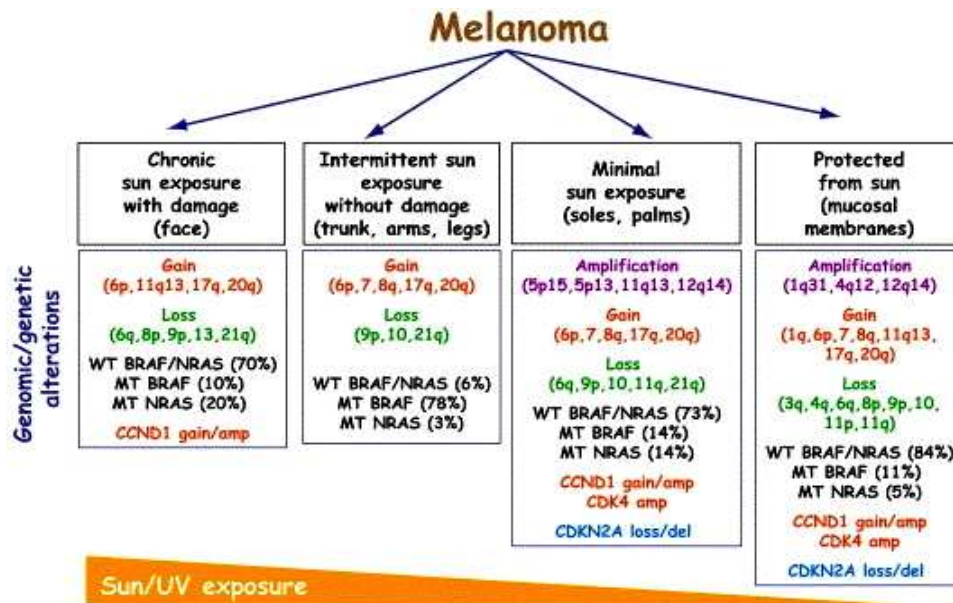


Fig I.19. Resumen de las alteraciones genéticas en melanomas con una exposición solar variable. *Kabbarah & Chin. Cancer Cell, 2005 (263).*

5. Marcadores moleculares en el diagnóstico de las lesiones melanocíticas (Tabla I.4)

Existe una larga lista de marcadores moleculares implicados en la progresión del melanoma, que a su vez ha permitido hacer comparaciones entre el nevus melanocítico, el melanoma primario y el melanoma metastático. Ninguno de estos marcadores moleculares, inmunohistoquímicos o cromosómicos son capaces de diferenciar inequívocamente los melanocitos benignos del nevus, de los melanocitos malignos del melanoma. Sin embargo existen muchos estudios que intentan correlacionar el incremento o la disminución en la expresión de marcadores específicos con nevus melanocítico adquirido, nevus displásico, fase de crecimiento radial del melanoma primario, fase de crecimiento vertical, o melanoma metastático (Tabla I. 4, Figuras I. 20 y I. 21) (264-267).

La mayor limitación de estos biomarcadores es el hecho de que de forma aislada no todos los nevus melanocíticos y los melanomas expresan el marcador en cuestión (268,269). Por ejemplo, alrededor del 4% de los melanomas no muestran alteraciones en el número de copias de ADN por CGH, cuando en la mayoría de los melanomas son múltiples las alteraciones (270).

6.1. Marcadores de diferenciación melanocítica

La mayoría de los melanomas no requieren técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) para su diagnóstico definitivo. Sin embargo, en casos de variantes raras (melanoma de células

fusiformes) o de metástasis, las técnicas de IHQ confirman el diagnóstico y facilitan la estadificación (267, 271,272). El marcador ideal de diferenciación melanocítica combinaría alta sensibilidad y especificidad, sin embargo, dicho marcador no existe todavía. Los marcadores más habitualmente utilizados son:

- vimentina y proteína S-100 marcan prácticamente todos los melanomas y nevus melanocíticos (muy sensibles). Sin embargo no son específicos de proliferaciones melanocíticas (272,273).
- HMB-45/gp100, MART-1/Melan-A y tirosinasa son muy específicos de células de extirpe melanocítica. Sin embargo, aproximadamente el 20% de los melanomas cutáneos no expresan ninguno de estos tres marcadores (274).
- MITF, proteína nuclear, es un marcador muy sensible, con expresión marcada en prácticamente todas las lesiones melanocíticas (275). Sin embargo, no es absolutamente específico de los melanomas (276).
- TRP-1 y TRP-2 (proteínas relacionadas con la tirosinasa), son productos relacionados con la melanogénesis, que se pierden durante la progresión tumoral (lo que se podría explicar por la desdiferenciación tumoral) (277).
- MUM-1, es miembro de la familia de los factores de transcripción del factor regulador del interferón (274). Es un marcador muy específico de los tumores hematolinfoides y melanocíticos, y muy sensible en las lesiones melanocíticas: se expresa en melanomas primarios y metastáticos y en nevus benignos.
- MC1R es un marcador relativamente específico y sensible, que marca prácticamente todos los melanomas primarios y metastáticos (278).

El “marcador” más frecuentemente utilizado para el diagnóstico es una combinación de marcadores que incluye la proteína S-100 con, por lo menos, uno de los marcadores más específicos de diferenciación melanocítica.

6.2. Marcadores de progresión en melanoma

Los marcadores de progresión del melanoma muestran una expresión **preferente** en uno o varios estadios del desarrollo tumoral. Surgen predominantemente de las células del melanoma, pero pueden hacerlo de componentes del estroma. El distinto nivel de expresión de dichos marcadores durante la tumorigénesis no significa necesariamente que tengan valor pronóstico (279). Se usan preferentemente para orientar el diagnóstico entre lesiones melanocíticas benignas de lesiones melanocíticas malignas.

6.2.1. Factores de crecimiento y receptores de los factores de crecimiento

La relación entre un tumor maligno y su aporte vascular es un importante factor que influye en el crecimiento y la progresión de dicho tumor.

- * VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial, es un factor angiogénico (280) que se

puede detectar en melanomas primarios y metastáticos (hasta en un 80% de los casos), mientras que los nevus melanocíticos adquiridos y atípicos no lo expresan (281).

- * bFGF, el factor de crecimiento fibroblástico, raramente se expresa en melanocitos normales, aunque sí, de forma más o menos intensa, en nevus y melanomas (282,283). Todavía no está bien definido su valor diagnóstico.

- * Recientemente el VEGF receptor-3 (VEGFR-3, también llamado Flt-4), descrito como marcador microvascular, se ha identificado en la progresión del melanoma. En lesiones benignas su expresión se limita a vasos linfáticos; mientras que con el desarrollo del potencial metastático, su expresión se extiende a los neovasos sanguíneos (284).

- * TGF- β ("Transforming growth factor") está implicado en varios procesos biológicos: angiogénesis, desarrollo y progresión de los tumores (285). Se expresa intensamente en melanomas primarios gruesos y melanomas metastáticos, por lo que podría ser considerado un buen marcador para lesiones melanocíticas avanzadas. Sin embargo, los nevus melanocíticos pueden expresarlo también, lo que lo hace un marcador menos atractivo (286).

- * EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) muestra un importante incremento con la transformación maligna de las lesiones melanocíticas. Sin embargo, no se han observado grandes diferencias entre los melanomas *in situ* y lesiones invasivas o metastásicas (287,288).

- * La osteonectina muestra un patrón similar, se expresa intensamente en melanomas primarios y metastáticos, moderadamente en la mayoría de nevus atípicos, y escasamente en nevus melanocíticos. Los melanocitos normales no expresan osteonectina (289).

- * El receptor transmembrana c-kit (CD117) se expresa en lesiones melanocíticas benignas y en el melanoma en fase decrecimiento radial. Sin embargo, en la fase de crecimiento vertical y en la fase metastásica, la expresión es muy baja o no existe (290,291).

6.2.2. Moléculas de señalización/ factores de transcripción

- * Varios estudios se han centrado en las mutaciones del gen PTEN en melanoma primarios, metastáticos, y en cultivo, sin embargo todavía no se conoce a fondo su función (292, 293). Recientemente se ha descrito la presencia de la proteína PTEN en tumores melanocíticos benignos, y su ausencia en la mayoría de melanomas cutáneos primarios (294). La disminución de la expresión de PTEN es más llamativa incluso en melanomas metastáticos (295). Esto sugiere un posible papel supresor de PTEN en la patogenia del melanoma.

- * Akt es un componente fundamental de la vía de señalización PI3K y juega un papel importante en la supervivencia celular. Se observa positividad para la mayoría de las lesiones melanocíticas malignas, mientras que los nevus no lo expresan (296).

- * El factor de transcripción AP2, junto con c-kit juega un papel importante en la transición de las células del melanoma de la fase de crecimiento radial a vertical (297). Su expresión es comparable a la de c-kit (291).

- * ATF-1 es un factor de transcripción, que no se detecta en melanocitos normales, pero que frecuentemente se expresa en melanomas metastáticos. También se ha observado un

incremento de su expresión entre la fase de crecimiento radial y la vertical (298).

6.2.3. Moléculas de proliferación.

Las lesiones neoplásicas se definen como un desorden proliferativo clonal que se caracteriza por un crecimiento celular no coordinado, que es el resultado de un cúmulo de mutaciones genéticas y eventos epigenéticos (ya comentado). Varios textos en la literatura han estudiado marcadores biológicos relacionados con el ciclo celular en lesiones melanocíticas que se correlacionan con la progresión de las mismas (264, 267, 299,300).

* Ki- 67 (MIB-1) o el antígeno nuclear proliferante (PCNA) son proteínas que cuantifican el índice proliferativo. Ki-67 es el más reproducible; se detecta en el núcleo de las células durante las fases finales de G1, S, G2, y M (300). Se observa un importante incremento de expresión entre lesiones melanocíticas benignas y melanoma. Los mayores niveles se observan en lesiones metastásicas (301).

* Las ciclinas regulan el ciclo celular junto con las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La inmunoreactividad para las ciclinas A, B, D1/D3 y E es significativamente mayor en melanomas que en nevus (302,303). Las ciclinas A y D3 son importantes factores pronósticos directamente relacionados con el espesor tumoral (303,304). Sin embargo, en la ciclina D1 se ha observado mayor expresión en melanomas primarios que en melanomas metastáticos; se relaciona con posibles interacciones con factores de crecimiento específicos presentes en el entorno (303, 305). La ciclina E se haya incrementada durante la progresión tumoral (277).

* Las CDKs están bajo el control de los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKIs): p16^{INK4A}, p21^{WAF1} y p27^{KIP1}. La p16^{INK4A} (CDKN2A) inhibe la vía de las ciclinas, bloqueando la progresión del ciclo celular después de la fase G1 (306). Se ha observado una disminución de su expresión en fases avanzadas del tumor (307). La pérdida de la proteína p16 se asocia con la capacidad invasiva, metastásica, de recidiva e incluso con un peor pronóstico (308). p21^{WAF1} inhibe la progresión del ciclo celular en las fases G1 y G2 (309). Los niveles de p21 son bajos o indetectables en la mayoría de las lesiones melanocíticas benignas, con mayor expresión en las lesiones melanocíticas malignas en general (310). p27^{KIP1} tiene una alta expresión en melanocitos normales y nevus; y disminuye en la progresión del tumor maligno (311).

* El gen supresor p53 tiene un importante papel en la reparación del ADN dañado, y en la inducción de la apoptosis cuando el daño no se puede reparar (312). Son varios los tumores malignos que tienen un p53 mutante con una función alterada. La disfunción de p53 generalmente se asocia con una mayor expresión de la proteína p53 (313,314). Aunque, en el melanoma todavía no está claro el papel que juega la proteína p53.

* HDM2 (el homólogo humano del mdm-2) es un regulador negativo de la vía del p53 (ya comentado). En condiciones normales, no se detecta la expresión de HDM2, sin embargo aumenta con la génesis tumoral. Se piensa que la hiperexpresión de HDM2 es un hecho temprano que se conserva posteriormente durante la progresión de melanoma primario a melanoma metastático (315).

6.2.4. Moléculas de adhesión.

Como ya se ha comentado anteriormente, las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular juegan un importante papel en la supervivencia celular, y en su crecimiento, diferenciación y migración.

* Catenina- β forma parte del complejo de adhesión cadherina-E/catenina- β . Algunos estudios sugieren que la expresión de catenina- β no cambia de forma significativa durante la progresión melanocítica (316). Sin embargo, otros revelan una disminución de su expresión membranosa durante la tumorigénesis (317).

* Para la cadherina E se ha descrito una disminución de la expresión y alteración de la adherencia celular durante la progresión tumoral (318). La pérdida de la cadherina E funcionante es paralela a un incremento de cadherina N que interviene en la interacción entre las células de melanoma, y promueve la migración y la supervivencia de las mismas (319).

* Las integrinas son proteínas transmembrana implicadas en la interacción célula-matriz extracelular, adhesión celular y migración (320). $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$ son integrinas que se expresan en mayor grado en fases tardías de melanoma y melanoma metastático (321). Es importante resaltar que existe una importante expresión de la integrina- β_3 en melanomas en fase de crecimiento vertical y melanoma metastático, mientras que resulta negativa en melanomas en fase de crecimiento radial. Se ha descrito también correlación entre la expresión de la integrina- β_3 , el espesor tumoral, y un peor pronóstico (322).

* Otras moléculas de adhesión celular parecen estar involucradas en la progresión tumoral: ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular), MelCAM/MUC18 ("*Mel-cell adhesión molecule*"), ALCAM ("*Activated leucocyte cell adhesión molecule*") y VCAM-1 ("*Vascular cell adhesión molecule*"), integran la superfamilia de las inmunoglobulinas y están implicadas en el desarrollo de metástasis en el melanoma (323,324).

6.2.5. Proteasas

La degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular es un paso fundamental en la migración, invasión y metástasis del melanoma.

* las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y sus inhibidores específicos titulares (TIMPs) juegan un importante papel en este proceso. MMP-2 resulta muy positivo en melanomas en fase de crecimiento vertical y en las metástasis, mientras que las células névicas y las lesiones de melanoma in-situ muestran una tinción débil o negativa (257, 281). MMP-2 se expresa también fuertemente en los fibroblastos y macrófagos adyacentes a las células del melanoma (257). La expresión de MMP-2 se correlaciona con peor índice de supervivencia. También existe un incremento de la expresión de la metaloproteinasa de la matriz asociada a membrana MT1-MMP durante la progresión tumoral (257), aunque no tan importante como MMP-2.

* la expresión de catepsinas B, L y D, se observa en melanomas primarios, metastáticos y nevus melanocíticos; más intensa en melanomas metastáticos (325,326).

* Por otra parte, la proteína de activación de fibroblastos (FAP), una proteasa que se expresa en los fibroblastos estromales de nevus y de melanomas, está incrementada durante la transformación maligna de las células melanocíticas (327).

6.2.6. Otras proteínas

* APAF-1 juega un importante papel en la apoptosis dependiente de mitocondria. La pérdida de la expresión de APAF-1 se relaciona con la transformación maligna del melanoma. Existe una correlación negativa entre el nivel de expresión de APAF-1 y el espesor tumoral (328).

* Metalotioneínas (MTs) son un grupo de pequeñas proteínas con una gran afinidad hacia los metales pesados (zinc, cobre, cadmio) (329). Los nevus raramente muestran positividad para MTs, mientras que en los melanomas su expresión se asocia fuertemente con la progresión tumoral (330). Se ha demostrado incluso que se trata de un factor de mal pronóstico independiente.

* La expresión de versican es nula en nevus melanocíticos comunes, de débil a fuerte en nevus atípicos e intensa en melanomas primarios y metastáticos (331).

* El caldesmón (h-CD) y la calponina h1 (CNh1) son proteínas implicadas en la contracción del músculo liso. Se ha estudiado su expresión en vasos sanguíneos de melanomas (332), y ambos muestran una disminución importante en tumores melanocíticos malignos en comparación con los nevus comunes.

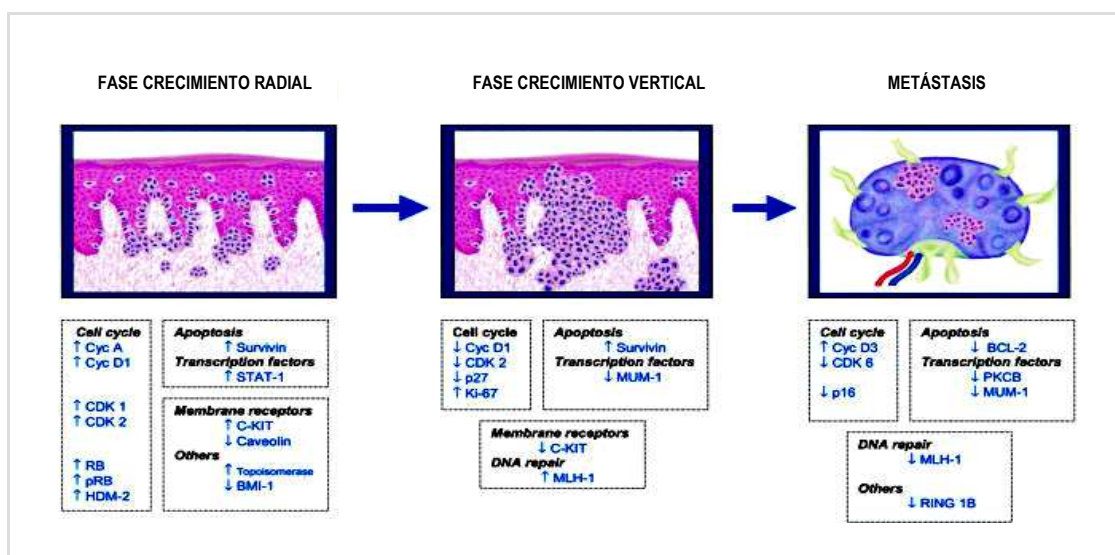


Fig I. 20. Progresión del melanoma. Proteínas representativas diferencialmente expresadas en distintas fases de progresión del melanoma maligno, identificadas por análisis de TMA. Alonso SR et al. *Am J Pathol* 2004, 193-203 (265).

Sin embargo, ninguno de estos marcadores ha demostrado, de forma aislada, suficiente sensibilidad/especificidad para diferenciar entre melanomas y nevus, ni para predecir el estadio de progresión de un melanoma, debido a la heterogeneidad genética de las lesiones melanocíticas. Por otra parte, ningún estudio ha realizado un análisis masivo de marcadores

proteicos en nevus y melanomas, como el que realizamos nosotros en este estudio.

Marcadores moleculares		Progresión de las lesiones melanocíticas			Referencias
		Nevus	Melanoma 1º	Mtx melanoma	
Diferenciación melanocítica					
	Proteína S-100		+ sensible		272,273
	gp100/HMB45		+ específico		274
	MART-1/Melan-A		+ específico		274
	MITF		+ sensible/ - específico		275,276
	TRP-1		↓ progresión (desdiferenciación)		277
	TRP-2		↓ progresión (desdiferenciación)		277
	MUM-1		+ sensible		274
	MCR-1		Específico		278
Progresión de melanoma					
Fact. crecimiento/ Recept.	VEGF	-	+	+	280,281
	bFGF	+/-	+/-	+/-	282,283
	VEGFR-3	-	+/-	+	284
	EGFR	-	+	+	287,288
	Osteonectina	-	+	+	289
	c-kit	+	+/-	-	290,291
Moléculas señalización	PTEN	+	-	-	292-295
	Akt	-	+	+	296
Factores de transcripción	AP2	+	+/-	-	297
	ATF1	-	-/+	+	298
Moléculas proliferación	Ki-67 (Mib-1)	-	-/+	+	300,301
	PCNA	-	-/+	+	300
	Ciclinas A, B, D1/D3, E	-	-/+	+	302-305
	p16 ^{INK4A}	+	+/-	-	308
	p21 ^{WAF1}	-	-/+	+	309,310
	p27 ^{KIP1}	+	+/-	-	311
	p53	+/-	+/-	+/-	312-314
	HDM2	-	-/+	+	315
Moléculas adhesión	Catenina-β	+/-	+/-	+/-	316,317
	Cadherina -E	+	+/-	-	318
	Cadherina -N	-	-/+	+	319
	Integrinas α _v β ₃ , α ₅ β ₁	-	-/+	+	320-322
	ICAM	-	-/+	+	323
Proteasas	MMP-2	-	-/+	+	257,281
	MT1-MMP	-	-/+	+	257
	Catepsinas B, L, D	-/+	-/+	+	325,326
	FAP	-/+	-/+	+	327
Otras proteínas	APAF-1	+	-/+	-	328
	Metalotioneinas	-	-/+	+	329,330
	Versican	-	-/+	+	331
	Caldesmon h	+	-/+	-	332
	Calponina h1	+	-/+	-	332

Tabla I. 4. Clasificación de los marcadores de las lesiones melanocíticas

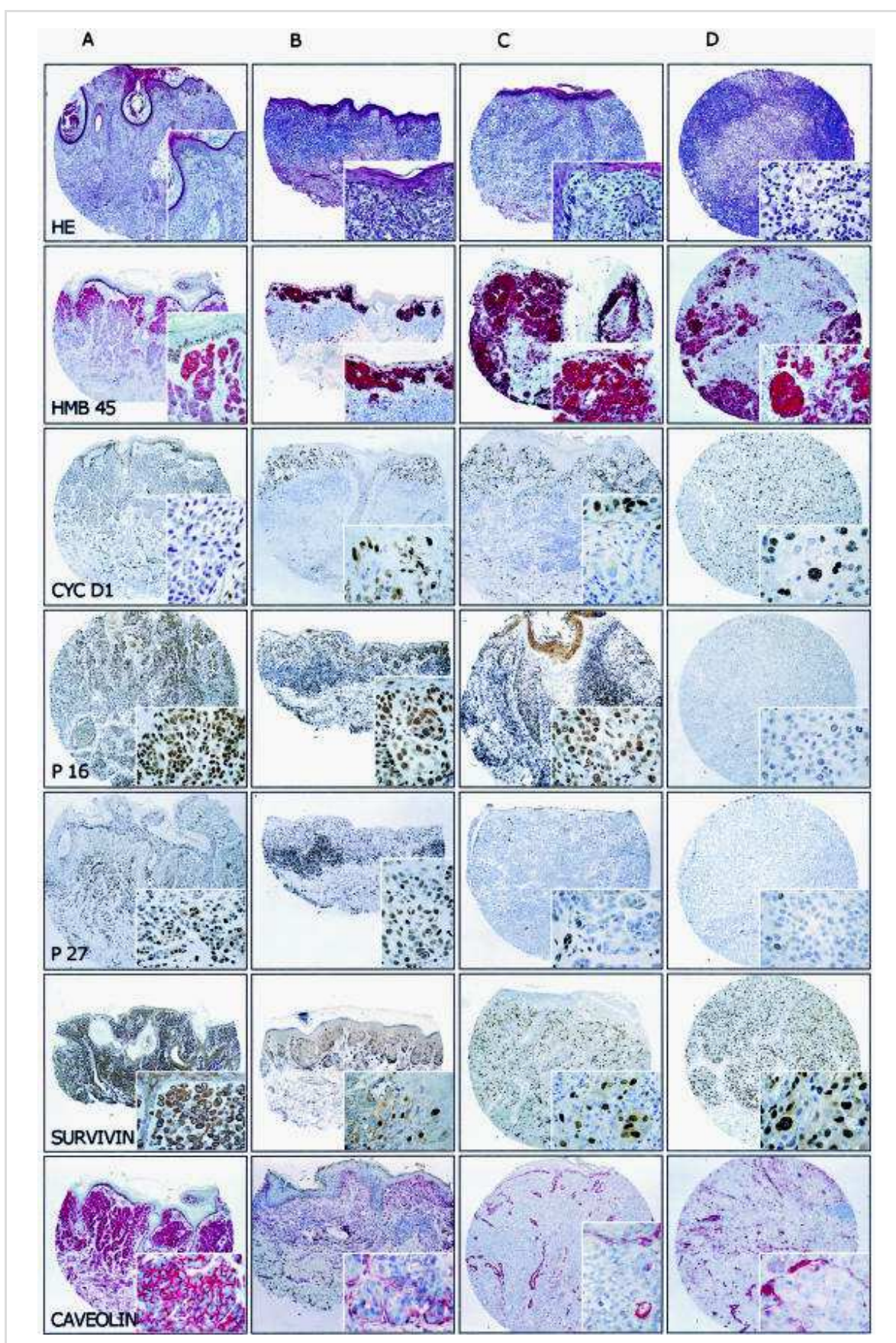


Fig I. 21. Expresión proteica en la progresión del melanoma: diseño con TMA ("tissue-arrays"). Los cilindros corresponden a nevus (a), fase de crecimiento radial (B), fase de crecimiento vertical (c) y metástasis (D). (Imágenes x40, x600, x800). *Alonso SR et al. Am J Pathol 2004, 193-203 (265).*

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Justificación

Los nevus melanocíticos son tumores benignos y, excepto por razones estéticas, su importancia radica en su posible relación con el melanoma como simuladores, marcadores de riesgo o posibles precursores. De entre todos, los nevus displásicos y los congénitos, especialmente los gigantes, son los de mayor potencial maligno. Los nevus displásicos y los de Spitz son los que más comúnmente se confunden con melanomas (18).

1.1. Nevus melanocíticos: marcadores de riesgo de melanoma

Aunque rodeado de mucha controversia, se ha demostrado en estudios de casos-controles y de cohortes (18,78,79,80,81,333-344) que el número de nevus y el número y la prevalencia de nevus displásicos son mayores en los casos que en los controles, por lo que el riesgo relativo de desarrollar melanoma en pacientes con gran número de nevus o de nevus displásicos es mayor que en la población general (78,79,80,81,333-341). Así, individuos con 100 o más nevus comunes adquiridos presentan 3,4 veces más riesgo de desarrollar melanoma que la población normal, e individuos con 10 o más nevus displásicos tienen 12 veces más riesgo (342-344).

Nevus comunes		Nevus displásicos	
Nº nevus	RR	Nº nevus	RR
0-24	1.0	0	1.0
25-49	1.5	1	2.3
50-99	3.0	2-4	7.3
100+	3.4	5-9	4.9
		12+	12.0

Tabla II.1. Riesgo relativo de melanoma en pacientes con nevus comunes/displásicos. Elder DE. Mod Pathol 2006:S4-S20 (18).

Aunque un factor de riesgo importante del melanoma es el número total de nevus del paciente, se ha visto que los nevus displásicos constituyen un factor de riesgo “per se”. Varios estudios basados en observaciones clínicas (71,334,338,340,342,345-347) estiman que este riesgo relativo (RR), varía entre un 3 y un 9. El trabajo de Titus-Ernstoff y cols (348), basado en datos histológicos, refiere un riesgo relativo de 6,2. Un factor a tener en cuenta en estos casos es la correlación clínico-patológica de los nevus displásicos, pues lesiones clasificadas clínicamente como nevus atípicos, posteriormente no son confirmadas histológicamente y al revés (70,349,350). A pesar de los estudios realizados, muchos autores siguen sin creer que los nevus displásicos sean un importante factor de riesgo de melanoma (46,47,60).

1.2. Simuladores del melanoma

Aunque la mayoría de las lesiones melanocíticas son fácilmente diagnosticadas con una alta especificidad y reproducibilidad, existe un conjunto de casos en los que el diagnóstico resulta muy difícil o casi imposible. Se han realizado muchos estudios para facilitar el acercamiento al diagnóstico en lesiones pigmentadas problemáticas (58), intentando clasificarlas y estableciendo una serie de pautas que faciliten el diagnóstico (351,352).

Los nevus displásicos presentan características atípicas tanto clínica como histológicamente. Sin embargo, varios trabajos han tratado de establecer criterios para diferenciar entre nevus displásicos, nevus comunes y melanomas en fase de crecimiento radial (18, 353). La cuestión resulta aún más complicada si se tiene en cuenta que existen nevus que sin mostrar los rasgos clínicos de los nevus displásicos, pueden mostrar dichas características histológicas (354,355).

Recientemente se han descrito muchas variedades de nevus melanocíticos adquiridos comunes susceptibles de ser confundidos con melanoma, como aquellos nevus de localizaciones especiales, los que presentan signos de regresión, o los antiguos. Aunque, en la mayoría de los casos, el examen histopatológico revela el diagnóstico.

Los nevus melanocíticos congénitos pueden mostrar crecimiento intraepidérmico pagetoide de los melanocitos, indistinguibles del epidermotropismo del melanoma. Estas lesiones que generalmente se presentan en placas, se caracterizan además por una pigmentación irregular. Histopatológicamente, los melanocitos se organizan en nidos o de forma aislada y pueden estar presentes en todo el espesor de la epidermis, incluyendo el estrato córneo. Los signos que ayudan al diagnóstico diferencial son el monomorfismo de los melanocitos intraepidérmicos, y la ausencia de atipia melanocítica en la dermis.

Los nevus congénitos gigantes, que constituyen un factor de riesgo conocido para el desarrollo de melanoma, pueden desarrollar nódulos proliferativos benignos en la dermis superficial o profunda (356) que simulan un melanoma aunque pueden regresar espontáneamente (357,358). Varios estudios han descrito criterios para el diagnóstico y el diagnóstico diferencial con el melanoma (358-360).

Los nevus de Spitz son nevus adquiridos característicos (ya comentados) que pueden simular un melanoma, especialmente su variante atípica con atipia citológica y arquitectural más o menos severa (361).

1.3. Precursores del melanoma

Como ya se ha comentado en la introducción, y siguiendo el modelo de Clark (121) en la carcinogénesis del melanoma, múltiples estudios (122,158,159) apoyan el modelo de progresión del melanoma en diferentes fases que se traducen en lesiones clínicas fácilmente reconocibles. Aunque se considere que los melanomas surgen a partir de melanocitos normales de la epidermis en ausencia de lesiones precursoras reconocibles, la correlación

observada en dichos estudios argumenta a favor del modelo de progresión tumoral propuesto, y de que los nevus displásicos están histogenéticamente relacionados o representan una fase de transición en el desarrollo del melanoma.

2. Hipótesis

Muchos de los estudios histológicos, estadísticos y clínicos sugieren que las distintas lesiones derivadas de los melanocitos representan diferentes fases en la progresión tumoral. Además la propiedad única de los melanocitos de sintetizar melanina, combinada con su localización cutánea, facilitan la detección de lesiones tanto malignas como de sus posibles precursores. Esto hace que el desarrollo del melanoma proporcione un excelente modelo para estudiar la progresión espontánea de un tumor sólido.

Recientes estudios biológico-moleculares permiten establecer algunas de las alteraciones que se producen en estas lesiones; sin embargo, los avances en la detección de anticuerpos que nos permitan el establecimiento de unos criterios objetivos en la clasificación de las lesiones melanocíticas son escasos y poco alentadores. Los estudios se centran en marcadores aislados, mientras que la evolución de la complejidad en los fenotipos observados en las lesiones melanocíticas refleja un proceso dinámico que implica la activación/supresión secuencial, más que una alteración simultánea de una variedad de genes independientes. Así, la expresión diferencial de marcadores de progresión en lesiones melanocíticas benignas y malignas podría establecer el papel de dichas moléculas en la transformación maligna de los melanocitos.

3. Objetivos

Dado que los criterios utilizados para la definición de las diferentes lesiones melanocíticas siguen siendo controvertidos/subjetivos en la práctica diaria, como objetivo fundamental para el desarrollo de esta tesis nos planteamos: identificar el perfil antigénico de las células melanocíticas en diferentes fases de la progresión tumoral, valorando el marcaje inmunohistoquímico con un amplio panel de proteínas (para el ciclo celular, la apoptosis, factores de transcripción, proteínas de reparación del ADN, proteínas de la transición epitelio-mesénquima y otras), en lesiones melanocíticas benignas y malignas y comparar su expresión en cada una de las lesiones con los fines siguientes:

1. Caracterizar/establecer una serie de marcadores moleculares inmunohistoquímicos que permitan una mejor **definición/clasificación** de los nevus melanocíticos adquiridos, congénitos, Spitz, displásicos.

2. **Comparar la expresión** de dichas proteínas en cada tipo de nevus melanocítico con la expresión en melanomas convencionales, en fase de crecimiento radial y vertical.
3. Buscar **diferencias** estadísticamente **significativas** en la expresión de dichas moléculas entre los distintos tipos de lesiones melanocíticas, que puedan apoyar un determinado diagnóstico, y en su caso predecir el comportamiento biológico de la lesión.
4. Determinar si los **nevus de Spitz** constituyen un subgrupo diferente dentro de los nevus melanocíticos, más cercano molecularmente a los melanomas y con mayor riesgo de progresión/malignización.
5. Definir las características inmunohistoquímicas del **nevus displásico** y determinar su comportamiento biológico en el espectro nevus-melanoma.
6. Definir la importancia del subgrupo de las moléculas implicadas en la **transición epitelio-mesénquima** en las lesiones melanocíticas y su posible implicación en la progresión de las lesiones benignas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras tisulares: selección de casos y controles

1.1. Selección de casos

Nuestro estudio reúne un total de 187 lesiones pertenecientes a 183 pacientes; 116 (64%) mujeres y 64 (36%) hombres, con edades comprendidas entre 2 y 91 años (media: 44,4 años). Todos los casos proceden del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, entre los años 1995 y 2005.

Los pacientes se seleccionaron personalmente de forma aleatoria, consultando el archivo del Servicio de Anatomía Patológica, y posteriormente se revisaron las historias clínicas de todos ellos para recoger los datos clínicos de interés y su evolución.

De los 183 pacientes, se estudiaron 187 muestras de lesiones proliferativas melanocíticas primarias tanto benignas (108 lesiones melanocíticas), como malignas (79 melanomas) remitidas tras la biopsia al Servicio de Anatomía Patológica, procedentes del Servicio de Dermatología, fijadas en formol tamponado al 4% e incluidas en parafina.

Los casos corresponden a:

- | | | |
|---------------------------------|---|--|
| 1) nevus melanocíticos comunes: | * nevus melanocíticos intradérmicos y compuestos | |
| | * nevus congénitos | |
| 2) nevus de Spitz | | |
| 3) nevus displásicos | | |
| 4) melanomas: | * Melanomas de extensión superficial
* melanoma nodular
* melanoma lentiginoso
* melanoma lentiginoso acral
* no clasificable | Clasificados en:
* Melanomas radiales
* Melanomas verticales |

Ninguno de los pacientes que presentaron nevus, tomados de forma aleatoria, refieren historia de melanoma. Y, de los 79 casos de melanomas, ninguno se presenta asociado a una lesión névica en la biopsia inicial. Únicamente uno de los casos de melanoma se asocia a epiteloma basocelular.

1.2. Selección de los controles

Para la realización de las matrices tisulares (o "tissue microarrays"), se seleccionaron también muestras de diferentes tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, procedentes de Archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre. Estos controles

corresponden a tejidos de características histológicas habituales: piel normal, amígdala, ganglio linfático, ocasionalmente hígado, y nevus melanocíticos adquiridos en el caso de las matrices de melanomas.

El empleo de estas muestras se realizó con el fin de tener controles internos de la técnica de inmunohistoquímica en cada “*tissue-array*”, y como control de calidad.

Tanto los casos como los controles se revisaron histopatológicamente y se confirmó el diagnóstico previo (**Tabla III.1**).

		Tipos histológicos	N (nº de casos)	Total	
CASOS	Lesiones melanocíticas benignas	Nevus melanocíticos intradérmicos	37	108	187
		Nevus melanocíticos compuestos	6		
		Nevus congénitos	11		
		Nevus de Spitz	28		
		Nevus displásicos	26		
	Melanomas	Fase de crecimiento radial	17	79	
		Fase de crecimiento vertical	62		
CONTROLES	Controles	Piel, piel normal, amígdala, ganglio linfático, hígado	24	24	24

Tabla III.1. Selección de casos y controles incluidos en nuestro estudio

2. Variables a estudio: clínicas, histopatológicas y biológicas

2.1. Variables clínicas

De todos los pacientes se revisaron las historias clínicas, con el fin de extraer los datos clínicos, especialmente relevantes en los casos de melanomas:

- Identificación del paciente
- Nº de biopsia
- Sexo
- Edad al diagnóstico
- Fecha de nacimiento y fecha del diagnóstico
- Diagnóstico clínico
- Localización de la lesión
- Morfología, tamaño y ulceración de la lesión
- Otras lesiones cutáneas
- Otros tumores

- En casos de melanoma: desarrollo de metástasis, tiempo transcurrido desde el diagnóstico inicial y localización
- Tratamiento
- Evolución
- Otros datos: fototipo, tipo de pelo, profesión ("outdoor"; "indoor")
- Antecedentes familiares

2.2. Variables anatomopatológicas

Para el estudio histopatológico, todas las muestras previamente seleccionadas ("punch" cutáneos, piezas de biopsia, piezas de extirpación cutáneas, y piezas de reextirpación) fueron inicialmente fijadas en formol al 4%, y posteriormente incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 3 micras que se tiñeron con hematoxilina-eosina convencional. Cualquier discrepancia entre los patólogos en el momento de la reevaluación del caso para la selección del mismo, se resolvió por consenso en el momento de la valoración, incluyendo para el estudio únicamente casos convencionales.

Se revisaron los casos para extraer los siguientes datos histopatológicos:

- Diagnóstico: * tipo histológico
 - * Subtipo histológico
- Tamaño de la lesión
- Morfología citológica
- Nivel de Clark (en casos de melanomas)
- Espesor de Breslow (en casos de melanomas)
- Fase de crecimiento (en casos de melanomas)
- Índice de mitosis (en casos de melanomas)
- Infiltrado inflamatorio linfocitario acompañante
- Ulceración

2.3. Variables moleculares

La selección de las proteínas que se incluyeron en el estudio inmunohistoquímico, se realizó basándose en una revisión extensa y exhaustiva de la literatura, así como en la experiencia y en los trabajos previos de nuestro grupo de investigación en relación con las alteraciones moleculares de los melanomas (239,265). La elección se basó también en la disponibilidad de los anticuerpos por parte de la Sección de Inmunohistoquímica del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre, y de la Unidad de Histología e Inmunohistoquímica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

Se seleccionaron 23 anticuerpos, con un importante papel importante en distintas etapas del desarrollo tumoral. Estos marcadores se han clasificado por categorías (**Tabla III.2**):

Las proteínas seleccionadas tienen un papel clave en determinadas funciones biológicas: a) alteración del ciclo celular, b) marcadores de proliferación, c) evasión de la apoptosis (o muerte celular programada), d) inestabilidad del ADN del material génico, e) receptores de membrana que transmiten señales extracelulares, f) capacidad para infiltración del estroma adyacente, g) otras.

	Marcadores moleculares
1. Proteínas específicas	HMB-45 Proteína S-100 Melan-A
2. Ciclo celular	Ciclina D1 CDK-4 p16 p21 p53 Rb
3. Apoptosis	survivina
4. Inestabilidad del DNA	MLH-1 MSH-2
5. Receptores de membrana	caveolina c-Kit
6. Proliferación	Ki-67
7. Transición epitelio-mesénquima	Cadherina N Cadherina E Osteonectina Osteopontina PKC α WT1
8. Otras proteínas	Topoisomerasa HLA

Tabla III.2. Marcadores moleculares utilizados en el estudio, clasificados por funciones biológicas

3. Realización de las matrices tisulares o “*tissue microarrays*”

La realización de las matrices tisulares es una labor relativamente sencilla, aunque laboriosa.

Los pasos a seguir se resumen previamente en la **Figura III.1**:

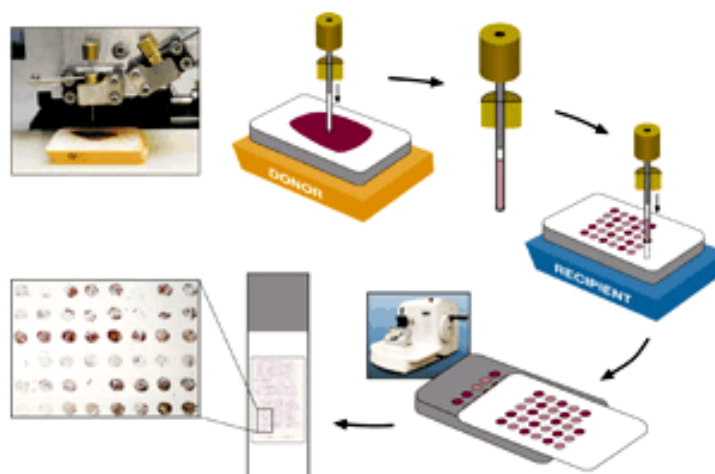


Fig III.1. Esquema de la construcción de un TMA.
Los pasos a seguir son:

1. Selección del material: bloques donantes.
2. Selección de la zona a pinchar dentro del bloque donante.
3. Diseño de la plantilla de TMA, mediante un programa informático que se plasma en el bloque receptor.
4. Realización del bloque receptor: pinchando sucesivamente los bloques donantes para posteriormente introducir los cilindros en el bloque receptor.
5. Cortes y tinciones de los “tissue-arrays”.

3.1. Selección del material

En cada una de las preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina convencional, se seleccionaron dos áreas representativas de la lesión con la ayuda del microscopio óptico, con el máximo volumen de células proliferantes e intentando incluir por un lado la unión dermo-epidérmica (zona más superficial), y por otro, la transición entre la lesión y la dermis adyacente (área más profunda). Se marcó con un rotulador el punto correspondiente a la zona elegida.

De las piezas quirúrgicas (en los casos de melanomas) se evaluaron todas las preparaciones histológicas del Archivo de Anatomía Patológica (del Hospital Universitario 12 de Octubre), seleccionando aquellas que contenían una mayor cantidad de tumor, representativa de la lesión, excluyendo áreas con intensa inflamación o necrosis.

3.2. Diseño del “tissue microarray”

Es uno de los puntos críticos en la realización de esta técnica. Para nuestro estudio confeccionamos una plantilla (modelo a seguir en la construcción del “array”), con la ayuda de un programa informático (hoja de cálculo de Microsoft Excel), y conociendo el número de casos que se iban a utilizar, con la distribución final de los mismos y los controles en el bloque receptor.

Para favorecer la técnica y homogeneizar la tinción inmunohistoquímica (mecanismo de capilaridad), colocamos los controles en los extremos (cuando fue posible). Para tener localizado cada caso, incluimos un cilindro de referencia, y marcamos unas coordenadas según la fila y la columna, siguiendo la plantilla realizada.

3.3. Selección del bloque donante

Una vez que se han seleccionado los cortes más representativos de cada caso, se seleccionan los bloques correspondientes en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica.

De cada uno de los casos y los controles escogimos el bloque que presentaba la mejor relación grosor-representatividad tumoral.

3.4. Rehacer los bloques donantes

Para intentar homogeneizar al máximo la técnica, se rehicieron los bloques seleccionados con el mismo tipo de parafina, intentando igualar el grosor de la parafina en todos ellos. También se rehicieron los bloques de los controles. El grosor medio de los bloques donantes utilizados para la construcción del TMA fue de 2mm.

3.5. Selección de la zona a pinchar en el bloque donante

Una vez que contamos con la preparación histológica y con el bloque de parafina seleccionados de cada caso, se enfrentó la preparación histológica con el bloque de parafina correspondiente y se marcaron las zonas elegidas en el bloque donante con un rotulador, tal y como se hizo previamente sobre las preparaciones histológicas. Sobre los controles se realizó el mismo marcaje de las áreas seleccionadas (**Figura III.2**).



Fig III.2. Cristal y bloque de parafina correspondiente marcados en el área seleccionada

En los casos nevus melanocíticos adquiridos compuestos, intradérmicos o los nevus de Spitz resulta fácil seleccionar una zona adecuada con áreas representativas de la lesión con el mayor volumen de células proliferantes, así como en los melanomas en fase de crecimiento vertical, que en general presentan gran volumen tumoral. En estos casos, se eligieron zonas tumorales representativas superficiales (incluyendo unión dermo-epidérmica), y profundas (dermis reticular, y en su caso, tejido celular subcutáneo) para valorar posibles diferencias en el seno de una misma lesión.

En los casos de nevus displásicos, y de melanomas en fase de crecimiento radial, que presentan menor volumen tumoral, y frecuentemente las células neoplásicas están enmascaradas por el pigmento de melanina, resulta más difícil la interpretación de los cilindros. Por ello, se intentó seleccionar la zona más representativa, menos pigmentada y más valorable de la lesión.

Con las muestras correspondientes a los controles se siguió el mismo procedimiento.

3.6. Preparación del bloque receptor

La fase de realización de las matrices tisulares se llevó a cabo tanto en el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid, como en el laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Se preparó un bloque de parafina habitual “en blanco”, para utilizar como receptor de las muestras tisulares. Es importante que no existan agujeros en el bloque, causados por burbujas de aire (aparecidas durante la preparación del bloque, y es importante alisar la superficie del bloque antes de empezar a insertar los cilindros (desgastando un poco la parafina).

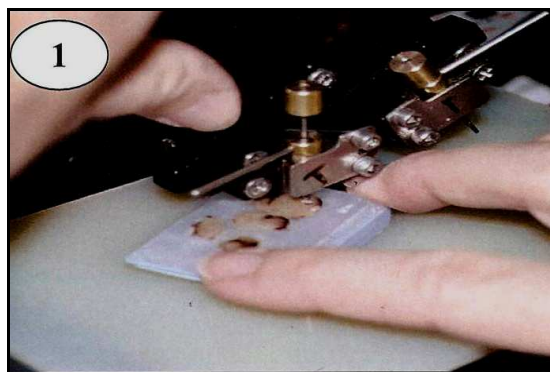
3.7. Construcción del “array”

Para su construcción se emplea un *Arrayer* de la marca Beecham Instruments (Hackensack, USA), dotados de medición digital micrométrica y agujas de 1,5mm de diámetro (**Figura III.3**).

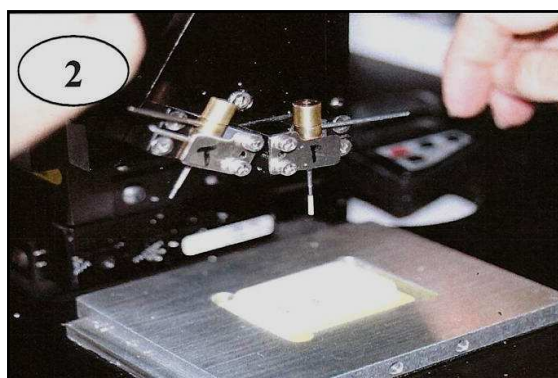
La aguja más gruesa de cada juego es la que hace el agujero en el bloque donante, y la más pequeña hace el cilindro en el bloque receptor. Se debe de ajustar la profundidad de descenso de las agujas (aproximadamente 3mm). Una vez ajustado el bloque receptor en el portabloques de modo que la superficie del bloque sea paralela a la placa base, se efectúa el agujero correspondiente en el bloque de parafina receptor. A continuación se coloca el bloque donante sobre un puente por encima del portabloques y se cambia la posición de las agujas. Se pincha el bloque donante, se retira el puente con el bloque donante y se expulsa el cilindro de tejido exactamente encima del agujero realizado en la parafina, de modo que quede justo a nivel de la parafina, sin hundirlo (**Figura III.4**).



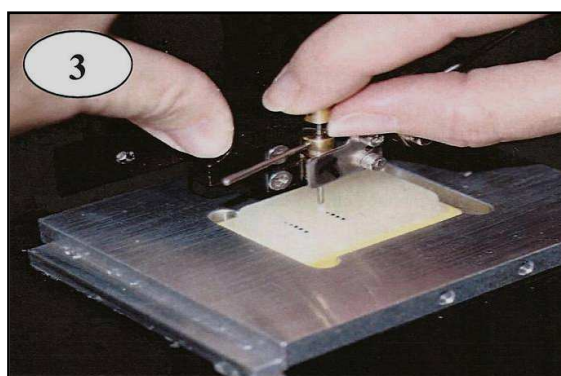
Fig III.3. Material necesario para la realización de las matrices tisulares: arrayer (Beecher Instruments), y bloques de parafina de los casos y controles



Paso 1



Paso 2



Paso 3



Paso 4

Fig III.4. Proceso de la construcción del "array". Proceso de construcción del "tissue-array": *Paso1:* se toma un cilindro-biopsia de la zona marcada en el bloque donante con una aguja de centro hueco; *Paso 2:* con otra aguja similar a la anterior pero de calibre más fino, se extra un molde de parafina del bloque receptor, empleando la coordenadas específicas medidas con precisión micrométrica; *Paso 3:* Se introduce el cilindro

tomado del bloque donante en el hueco que se ha dejado previamente en el bloque receptor; **Paso 4:** el cilindro se empuja y se encaja en el bloque receptor.

Este mecanismo es el que debe de proseguirse con todos los cilindros hasta la finalización del "tissue array".

De cada bloque seleccionado se toman dos cilindros o "cores" (correspondientes a las zonas previamente marcadas), y se colocan en filas y en columnas, siguiendo la plantilla previamente diseñada, separados unos de otros por una distancia aproximada de 1,5mm.

En total, para nuestro estudio empleamos 7 bloques receptores, se construyeron 7 "tissue microarrays", cada uno de los cuales contenía dos cilindros de cada caso problema y de cada caso control. Tras realizar la técnica, los bloques donantes mostraron una mínima pérdida del volumen tumoral (**Figura III.5**).

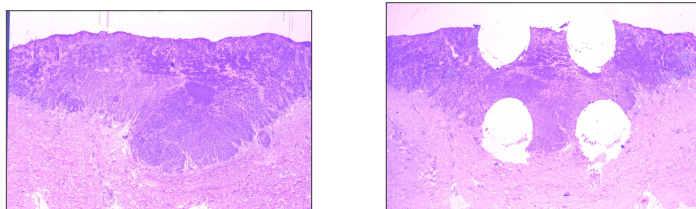


Fig III.5. Imagen de la muestra donante tras el proceso.

Una vez terminado el bloque receptor se introdujo en una estufa a 37°C durante 15 minutos, aproximadamente, lo que facilitó que los cilindros de tejido se adhirieran mejor a la parafina en los agujeros del bloque receptor (**Figura III.6**).



Fig III.6. Resultado final tras la construcción de un TMA (matriz tisular).

De los 7 TMAs construidos para nuestro estudio, 4 TMAs correspondían a lesiones melanocíticas benignas, 2 de ellos incluían a los 54 casos de nevus melanocíticos convencionales, nevus congénitos (11 casos que correspondía a 22 cilindros), y nevus melanocíticos adquiridos (43 casos: 86 cilindros); 1 de los bloques corresponde a los nevus de Spitz (28 casos: 56 cilindros); y el último a nevus displásicos (26 casos: 52 cilindros). El resto de los 3 TMAs correspondían a melanomas, 17 casos a melanomas en fase de crecimiento radial (34 cilindros) y 62 casos a melanomas en fase de crecimiento vertical (124 cilindros).

Ocasionalmente, se incluyeron subtipos de nevus diferentes de forma aleatoria en las matrices tisulares para que sirvieran como control interno de la técnica.

3.8. Corte de los tissue microarrays

Se realizaron 30 cortes iniciales de 3 micras cada uno, de cada uno de los bloques receptores, empleando para ello la técnica tradicional de microtomía: enfriando ligeramente los bloques antes de cortarlos, empleando un baño de agua caliente y utilizando portaobjetos xilenados (cargados electrostáticamente). Se descartó desde un principio el uso de sistemas de ayuda para la sección (cintas autoadhesivas, etc) (**Figura III.7**).

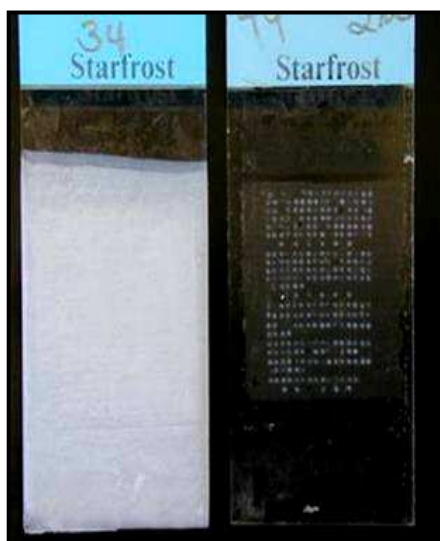


Fig III.7. Ejemplo de una preparación histológica parafinada (izquierda) para su óptima conservación, y después de su desparafinación (derecha).

Una vez cortados y montados los cristales, se realizó una tinción de Hematoxilina-eosina (**Figura III.8**) y posteriormente el estudio inmunohistoquímico que se detalla a continuación.

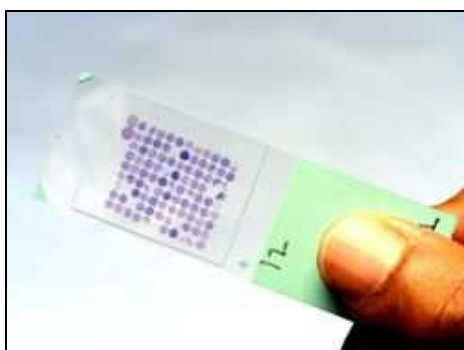


Fig III.8. Ejemplo de una preparación histológica de un TMAs teñido con hematoxilina-eosina

3.9. Almacenamiento de los cortes

Para proteger los cortes tisulares de la oxidación u otros daños, y para mantener su antigenicidad después del corte, los portaobjetos se introdujeron en parafina líquida y así se almacenaron (**Figura III.7**). Para su uso inmediato posterior, se eliminó la parafina dejando los portaobjetos en la estufa toda la noche a 56°C, y se introdujeron después en xilol, también en la estufa a 56°C durante 15-30 min.

3.10. Tinciones de inmunohistoquímica

El estudio inmunohistoquímico se efectuó tratando de identificar el producto proteico de una selección de genes estadísticamente y biológicamente significativos, que se seleccionaron por su papel fundamental en el desarrollo y progresión del melanoma. También se tuvieron en cuenta los marcadores descritos en estudios previos en este tipo de lesiones y que nos podrían ser de utilidad para nuestros objetivos.

El estudio inmunohistoquímico se realizó sobre secciones del material (fijado en formol e incluido en parafina) de 3 micras de grosor colocadas sobre portaobjetos cubiertos de forma específica para técnicas de inmunohistoquímica (DAKO, Glostrup, Denmark). Una vez desparafinadas las preparaciones, se rehidrataron utilizando una serie de alcoholes, y se lavaron con Buffer salino. Se realizó una fase de recuperación del antígeno inducida por calor en una olla a presión, en una solución de citrato de sodio (1 litro de 10mmol/L, pH 6,5, DAKO), previamente llevada a ebullición (siguiendo el método tradicional, Norton, 1994) y aclarada con agua corriente. En este momento se realizó el bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena mediante incubación con peróxido de hidrógeno al 1,5% (DAKO) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posterior lavado con agua destilada.

Para las tinciones de inmunohistoquímicas se utilizaron una serie de anticuerpos, que se detallan a continuación (**Tabla III.3**). Los anticuerpos utilizados en nuestro estudio (23 anticuerpos) se han clasificado por categorías atendiendo a su principal función biológica o a su mecanismo de acción.

La inmunodetección se realizó con anticuerpos secundarios y la visualización con diferentes técnicas según el anticuerpo: a) sistema de visualización LSAB (*Labelled streptavidin-biotin*: streptavidina conjugada con biotina) (DAKO) que utiliza peroxidasa-antiperoxidasa como método de inmunodetección y 3,3'-diaminobenzidina como cromógeno (preferentemente en marcadores nucleares); b) el sistema de visualización Envision (DAKO) que utiliza un bloqueante de la peroxidasa como método de inmunodetección y diaminobenzidina. La diferencia de este método radica en el empleo de una molécula sintética, "envision", multilink que favorece la unión múltiple del anticuerpo al antígeno. Todas las inmunotinciones se realizaron en un aparato automático de inmunotinción TechMate 500

(DAKO, Glostrup, Denmark). Se realizaron incubaciones omitiendo el antígeno específico como control negativo de la técnica ().

Todas las preparaciones se contrastaron con hematoxilina (DAKO), y se montaron de la manera habitual.

Proteína	Clon	Origen	Dilución	Desenmascaramiento
Cadherina-N	3B9	Zymed	1:25	Tampón citrato 10mM Ph6.5
Cadherina E	4A2C7	Zymed	1:100	Tampón citrato 10mM Ph6.5
Caveolina	2297	Transduction	1:25	Tampón citrato 10mM Ph6.5
CDK 4	35	Chemicon	1:100	Tampón citrato 10mM Ph6.5
Ciclina D1	DCS-6	DAKO	1:100	Tampón citrato 10mM Ph6.5
c-Kit	Policlonal	DAKO	1:50	Tampón citrato 10mM Ph6.5
Ki-67	MIB 1	DAKO	1:100	Tampón citrato 10mM Ph6.5
HLA*	J576	CNIO	1:150	Tampón citrato 10mM Ph6.5
HMB-45	HMB-45	BIOGENEX	1:10	Tampón citrato 10mM Ph6.5
MELAN A	A103	DAKO	1:10	Tampón citrato 10mM Ph6.5
MLH-1	G168-15	Pharmingen	1:100	Tampón citrato 10mM Ph6.5
MSH-2	FE11	ONCOGEN	1:100	Tampón citrato 10mM Ph6.5
Osteopontina	Policlonal	Abcam	1:1500	Tampón citrato 10mM Ph6.5
P16	F12	Sta. Cruz	1:50	Tampón citrato 10mM Ph6.5
P21	EA10	ONCOGEN	1:50	Tampón citrato 10mM Ph6.5
P53	DO-7	Novocastra	1:50	Tampón citrato 10mM Ph6.5
PKC α	H7	Sta Cruz	1:25	Tampón citrato 10mM Ph6.5
Rb	Policlonal	BD	1:250	Tampón citrato 10mM Ph6.5
S-100	Policlonal	DAKO	1:500	Tampón citrato 10mM Ph6.5
SPARC osteonectina	15G12	Novocastra	1:25	Tampón citrato 10mM Ph6.5
Survivina	Policlonal	RD Systems	1:1500	Tampón citrato 10mM Ph6.5
Topoisomerasa	Ki-S1	DAKO	1:400	Tampón citrato 10mM Ph6.5
WT1	6F-H2	DAKO	1:40	Tampón citrato 10mM Ph6.5

Pos/neg: positivo/negativo; BD:BD Biosciences/Transduction Labs (San Diego, California), DAKO Corp (Carpenteria, California), Zymed (South San Francisco, California)

* HLA DP; DQ; DR.

Tabla III.3. Anticuerpos, clones, casa comerciales, diluciones y protocolos de desenmascaramiento utilizados con los 23 marcadores.

De forma esquemática, a continuación se comentan los pasos que se siguieron con cada una de las técnicas:

Técnica LSAB:

1. Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena:
 - Eliminar el exceso de agua y secar cuidadosamente los bordes de la preparación.
 - Añadir suficiente cantidad de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la muestra.
 - Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - Lavar con agua destilada.
2. Bloqueo de las proteínas o de uniones inespecíficas:
 - Eliminar el exceso de agua y secar cuidadosamente los bordes de la preparación.
 - Añadir tampón (DAKO)
 - Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente,
 - Lavar con PBS o TBS (Tampón DAKO).
3. Anticuerpo 1º o reactivo control negativo:
 - Eliminar el exceso de agua y secar cuidadosamente los bordes de la preparación.
 - Añadir el Anticuerpo 1º o reactivo control negativo.
 - Incubar durante 25-40 minutos a temperatura ambiente.
 - Lavar con PBS o TBS (tampón DAKO).
4. Anticuerpo 2º o puente (*link*):
 - Eliminar el exceso de agua y secar cuidadosamente los bordes de la preparación.
 - Añadir unas gotas del anticuerpo 2º sobre la preparación.
 - Incubar durante 25 minutos a temperatura ambiente.
 - Lavar como en el paso nº 2.
5. Peroxidasa-estreptavidina:
 - Secar como antes.
 - Añadir la enzima hasta cubrir la muestra.
 - Incubar 25 minutos.
 - Lavar como antes.
6. Solución de sustrato-cromógeno:
 - Escurrir los cristales como anteriormente.
 - Añadir la solución preparada de sustrato de cromógeno
 - Incubar 5 minutos cuando se utiliza DAB.
 - Lavar con agua destilada.
7. Contra-tinción:
 - Cubrir la muestra con hematoxilina (DAKO)
 - Incubar de 2-5 minutos dependiendo del tipo de hematoxilina.
 - Lavar con agua destilada.
 - Sumergir 10 veces en agua amoniacal (opcional).
 - Colocar las muestras en agua destilada
8. Montaje:
 - Cuando se utiliza DAB como cromógeno se puede utilizar un medio de montaje permanente no-acuoso.

Técnica Envision Peroxidasa (DAKO)

1. Bloqueo de la actividad peroxidasa endógena:
 - Incubar con peróxido de hidrógeno al 3% (Blocking Solution DAKO), 5 minutos a temperatura ambiente.
 - Lavar con agua destilada o TBS (tampón DAKO) o PBS.
Este paso se puede hacer en cualquier momento antes de añadir la peroxidasa.
2. Bloqueo de las proteínas endógenas (albúmina o Tampón DAKO)
 - Incubar 5-10 minutos a temperatura ambiente.
 - Lavar con solución de lavado DAKO (TBS) o PBS
3. Añadir anticuerpo 1º:
 - Eliminar el exceso de agua y secar cuidadosamente los márgenes de la preparación.
 - Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
 - Lavar con solución de lavado DAKO (TBS) o PBS.
4. Añadir polímero marcado (anticuerpo 2º)
 - Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
 - Lavar con solución de lavado DAKO (TBS) o PBS.
5. Añadir la solución de sustrato-cromógeno DAB
 - Incubar 10 minutos aproximadamente.
 - Lavar con agua destilada.
6. Contra-teñir con hematoxilina DAKO
 - Incubar 2-5 minutos.
 - Lavar con agua destilada.
7. Montar las preparaciones: después de deshidratar (etanol y xilol).

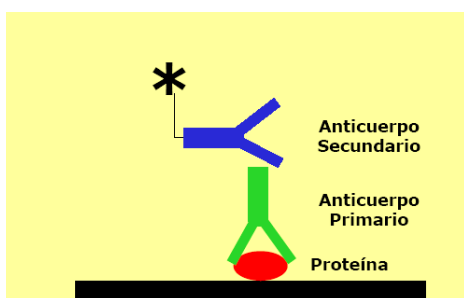


Fig III.9. Esquema básico de la tinción de inmunohistoquímica.

4. Valoración de las muestras

Se han analizado al menos dos cilindros de tejido de 1,5 mm de diámetro de cada uno de los casos y dos cilindros de cada uno de los controles. Con el fin de garantizar la reproducibilidad del método, se decidió emplear criterios uniformes, claros y contrastados en la literatura para los puntos de corte y métodos de valoración sencillos. Inicialmente, únicamente

se consideraron tres valores en los resultados inmunohistoquímicos: positivo intenso (+++), positivo leve-moderado (+) y negativo (-), en función del porcentaje de células teñidas en el momento de la evaluación de las muestras, y así se recogieron los datos. Posteriormente para simplificar el estudio y homogeneizar los criterios de valoración para los marcadores proteicos utilizados, se agruparon los resultados inmunohistoquímicos únicamente en dos grupos: valor 0-negativo, y valor 1-positivo (uniendo los casos positivos leves-moderados y aquellos casos positivos intensos), basándonos en criterios previamente establecidos en la literatura (239,265).

Todas las preparaciones fueron evaluadas minuciosamente de forma semi-cuantitativa, se valoró la intensidad de la expresión proteica y el porcentaje de las células positivas. La valoración se hizo sin tener conocimiento de ningún dato clínico. Tampoco se conocía inicialmente la distribución de los cilindros del mismo caso dentro de la matriz tisular. Se valoraron también, como ya se ha comentado anteriormente, la expresión de los marcadores en células que servían de controles internos tanto en casos como en controles.

Proteína	Sistema visualización	Score	Punto de corte (% células +)	Control positivo
Cadherina E	ENVIS/DAB	Pos/neg	≥5% membranoso	Cels. epiteliales
Cadherina-N	ENVIS/DAB	Pos/neg	≥5% membranoso	Musc. cardíaco
Caveolina	LSAB/DAB	Alto/bajo	≥50% membranoso	Cels. endoteliales
CDK 4	LSAB/DAB	Alto/bajo	≥5% nuclear	Cels. proliferantes
Ciclina D1	LSAB/DAB	Alto/bajo	≥30% nuclear	Endotelio Macrófagos
c-Kit	LSAB/DAB	Alto/bajo	≥50% membranoso	Melanocitos normales
Ki-67	LSAB/DAB	Alto/bajo	≥20% nuclear	Cels. proliferantes
HLA*	LSAB/DAB	Pos/neg	≥10% memb/cito	Centros germinales
HMB-45	LSAB/DAB	Pos/neg	≥50% citoplasma	Melanocitos normales
MELAN A	LSAB/DAB	Pos/neg	≥50% citoplasma	Melanocitos normales
MLH-1	LSAB/DAB	Alto/bajo	≥50% nuclear	Piel normal
MSH-2	LSAB/DAB	Alto/bajo	≥70% nuclear	Piel normal
Osteopontina	ENVIS/DAB	Pos/neg	>10% citoplasma	Cels. estromales Piel normal
P16	LSAB/DAB	Alto/bajo	≥50% nuclear/cito	Cel. Epiteliales Piel normal
P21	LSAB/DAB	Pos/neg	≥10% nuclear/cito	Aisladas cel. CG
P53	LSAB/DAB	Pos/neg	≥10% nuclear	Aisladas cel. CG
PKCα	LSAB/DAB	Alto/bajo	≥50% citoplasma	Linfocitos maduros
Rb	LSAB/DAB	Pos/neg	≥10% nuclear	Cels. proliferantes
S-100	LSAB/DAB	Pos/neg	≥30% cito/nuclear	Melanocitos normales, nervios
SPARC/ Osteonectina	ENVIS/DAB	Pos/neg	>10% citoplasma	Cels. Endoteliales en tumores malignos
Survivina	LSAB/DAB	Pos/neg	≥2% nuclear	Aisladas cels. CG
Topoisomerasa	LSAB/DAB	Pos/neg	≥10% nuclear	Cels. proliferantes
WT1	ENVIS/DAB	Pos/neg	≥10% nuclear/cito	Mesotelioma

Tabla III.4. Anticuerpos estudiados (sistema de visualización, patrón de reactividad, punto de corte, y controles positivos)

En la **Tabla III.4.** se establecen los criterios seguidos para cada marcador en este estudio en función del porcentaje de células que expresan el anticuerpo (punto de corte) y de la intensidad de la tinción, así como de la localización intracelular de la proteína.

5. Almacenamiento de datos

Los datos recogidos de todas las variables clínicas se incluyeron en una base de datos (Aplicación informática Microsoft EXCEL), al igual que los datos histopatológicos y moleculares.

6. Estudio estadístico

Este trabajo es un estudio transversal en el que se analiza el perfil de expresión de diferentes lesiones pigmentarias: nevus melanocíticos comunes, nevus de Spitz, nevus displásicos y melanomas en fase de crecimiento radial y en fase de crecimiento vertical. Los nevus melanocíticos adquiridos comunes incluyen tanto nevus melanocíticos intradérmicos (los más frecuentes en nuestro estudio) como nevus melanocíticos compuestos; se han estudiado de forma conjunta debido a la similitud de la características histopatológicas de ambas entidades y por el reducido número de nevus compuestos incluidos en el estudio. Los nevus seleccionados para la construcción de las matrices tisulares corresponden a una serie de lesiones consecutivamente extirpadas y diagnosticadas en el Hospital 12 de Octubre en el año 2005. La serie de melanomas primarios (radiales y verticales) corresponden también a lesiones consecutivamente biopsiadas y extirpadas nuestro Hospital entre los años 1995 y 2000. De entre todas las muestras inicialmente seleccionadas, se descartaron aquellas que no contenían material representativo y valorable para nuestro estudio.

6.1. Análisis Descriptivo

En primer lugar se efectuó un análisis descriptivo teniendo en cuenta:

- Variables epidemiológicas (edad, sexo) y clínicas (de especial relevancia en los casos de melanomas)
- Variables histopatológicas
- Variables moleculares (para las que inicialmente se describieron los puntos de corte)

6.2. Análisis de la expresión molecular según el tipo histológico

Se comparó la expresión de cada marcador molecular entre los diferentes tipos de lesiones melanocíticas, tomadas de dos en dos, para establecer las diferencias significativas entre cada grupo, utilizando el Test Exacto de Fisher. Las diferencias de expresión en los distintos marcadores moleculares entre dos grupos se consideraron estadísticamente

significativas cuando la $p < 0.05$. Se calcularon además las P corregidas según el método propuesto por Hochberg y Benjamín (False discovery rate) como previamente se realizó (265), para obviar la posibilidad de falsos positivos cuando varias hipótesis son probadas simultáneamente.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

En esta sección, comentaremos las características clínicas, histopatológicas e inmunohistoquímicas de las lesiones melanocíticas previamente seleccionadas.

1. Características clínicas de las lesiones melanocíticas

Como ya se ha comentado anteriormente, nuestro estudio reúne un total de 187 lesiones pertenecientes a 183 pacientes. De estas, 108 de los casos corresponden a lesiones melanocíticas benignas (43 nevus melanocíticos adquiridos, 11 nevus congénitos, 28 nevus de Spitz y 26 nevus displásicos) y 79 casos corresponden a melanomas (17 melanomas en fase de crecimiento radial y 62 en fase de crecimiento vertical).

1.1. Edad

Disponemos de una serie de 183 pacientes en total, con edades comprendidas entre 2 y 91 años, con una media de 44,4 años (**Tabla IV.1**).

Lesiones melanocíticas	Rango de edad (años)	Media (años)
Lesiones benignas	2-71 años	33 años
Nevus congénitos	14-54 años	30.1 años
Nevus adquiridos	14-71 años	37.2 años
Nevus de Spitz	2-51 años	23.3 años
Nevus displásicos	13-65 años	39 años
Melanomas	21-91 años	60 años
Total	2-91 años	44.4 años

Tabla IV.1. Variable "edad" en las lesiones melanocíticas

La media de edad es claramente menor en el grupo de la lesiones melanocíticas benignas (33 años) frente a las lesiones melanocíticas malignas (60 años). Cabe destacar, que la media de edad en los nevus de Spitz es la menor de entre todas las lesiones melanocíticas benignas: 23,3 años (rango: 2-51 años).

1.2. Sexo

En nuestra serie, la mayoría de pacientes son mujeres: 62.7% mujeres y 37.4% hombres (**Figura IV.1**).

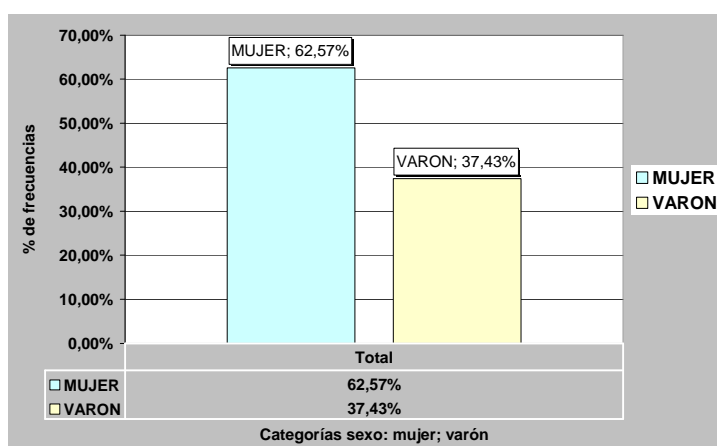


Fig IV.1. Variable "sexo" en las lesiones melanocíticas.

En relación con el tipo de lesiones melanocíticas, se observa que la proporción por sexos (mujeres/hombres) en lesiones benignas es claramente mayor ($r=2.2$) que en melanomas ($r=1.2$), en los que no se observa diferencia (**Figura IV.2**). Esta observación puede estar en relación con razones estéticas.

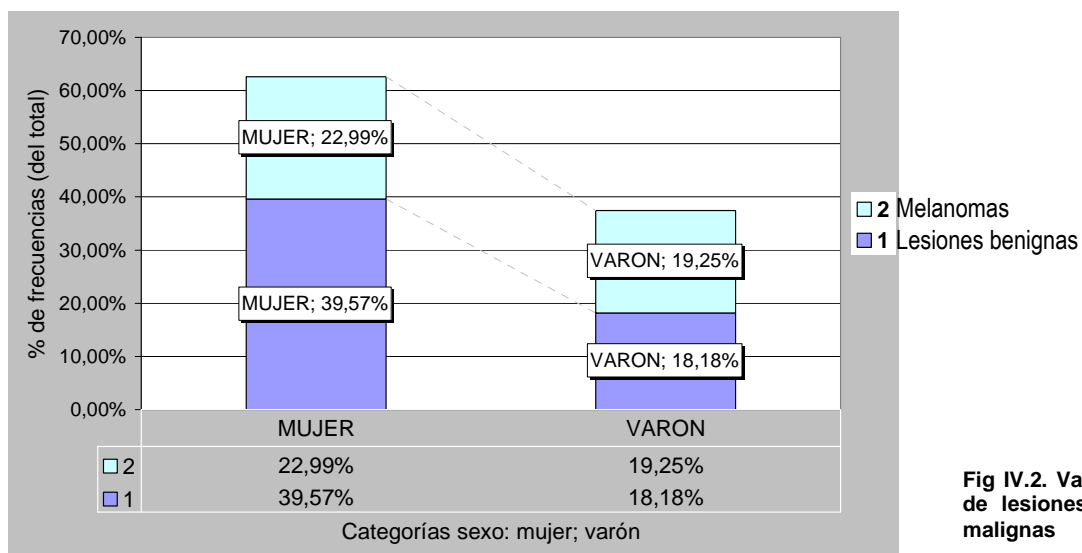


Fig IV.2. Variable "sexo" según el tipo de lesiones melanocíticas: benignas-malignas

En las lesiones benignas, en relación con el tipo de nevus (nevus congénito, nevus adquirido común, nevus de Spitz, o nevus displásico), se observa una mayor diferencia entre sexos para nevus adquiridos intradérmicos/compuestos (31.5% en mujeres frente a 8.3% en varones) y nevus congénitos (8.3% en mujeres frente a 1.8% en varones) (**Figura IV.3**).

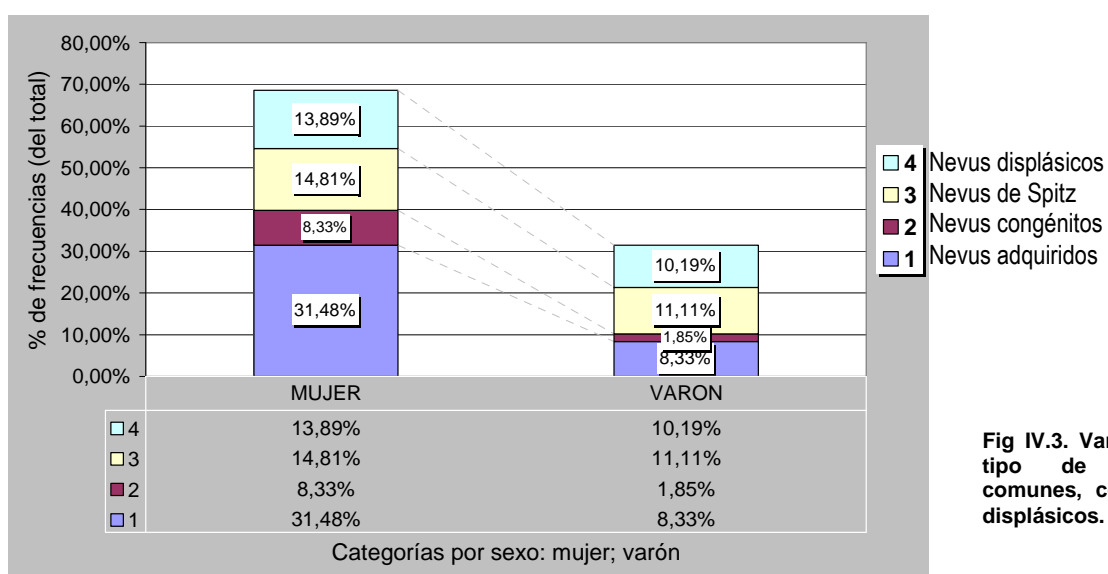


Fig IV.3. Variable "sexo" según el tipo de nevus: adquiridos comunes, congénitos, de Spitz y displásicos.

1.3. Localización de las lesiones melanocíticas

La localización más frecuente de las lesiones melanocíticas es el tronco (30.5%), con proporción similar entre las lesiones benignas (16.6%) y melanomas (13.9%). Las localizaciones en cabeza y cuello y extremidades representan respectivamente 16% y 15.5% de las lesiones melanocíticas en general (4.8% en extremidades superiores y 10.1% en extremidades inferiores), sin diferencias significativas entre nevus y melanomas. Sin embargo, cabe destacar las zonas acrales como una zona predilecta de aparición de los melanomas: hasta en el 4.8% de los casos de lesiones melanocíticas, todos correspondientes a melanomas (11.4% de todos los melanomas de nuestra serie). En el 33.2% de los casos (totales) no se conocía la localización de la lesión (**Figura IV.4**).

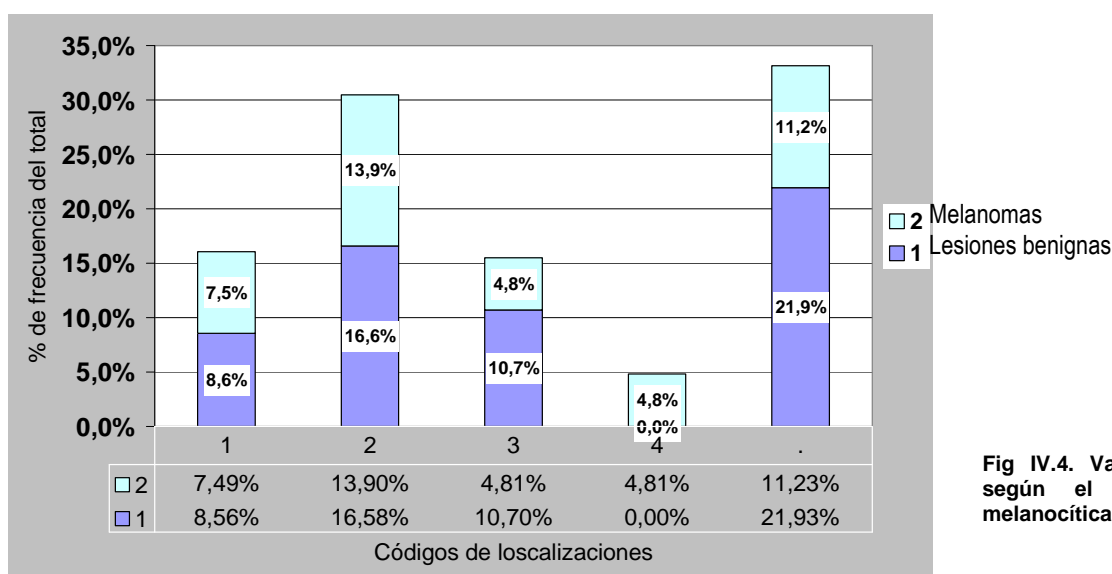


Fig IV.4. Variable "localización" según el tipo de lesiones melanocíticas.

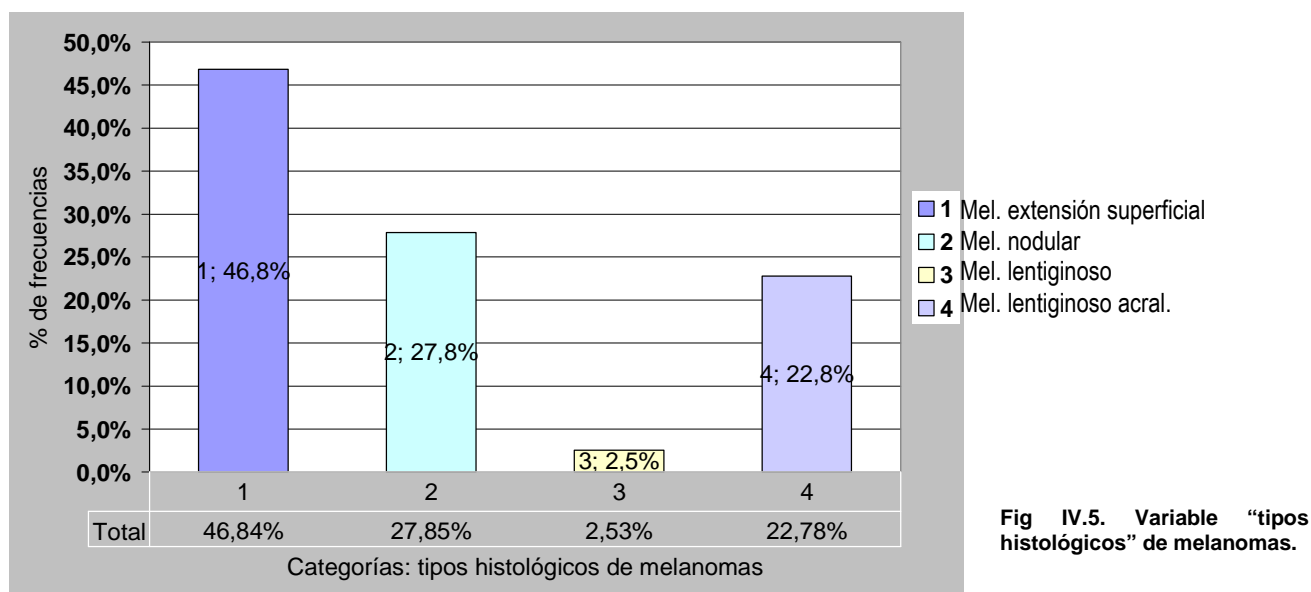
Los Códigos de las localizaciones son: 1. cabeza-cuello; 2: tronco; 3: extremidades; 4: acrales; 5. No dato

1.4. Dimensión de las lesiones melanocíticas

Las lesiones melanocíticas de nuestra serie tienen un diámetro máximo medio de 10.9 mm; siendo el diámetro máximo (medio) de los nevus: 6.5 mm, y el de los melanomas primarios: 16.2 mm. Entre las lesiones benignas, los de mayor tamaño son los nevus congénitos, con un diámetro máximo medio de 10.2 mm.

1.5. Tipos histológicos de melanomas

En nuestra serie, los 79 melanomas, se clasificaron inicialmente según los tipos histológicos clásicos (**Figura IV.5**):

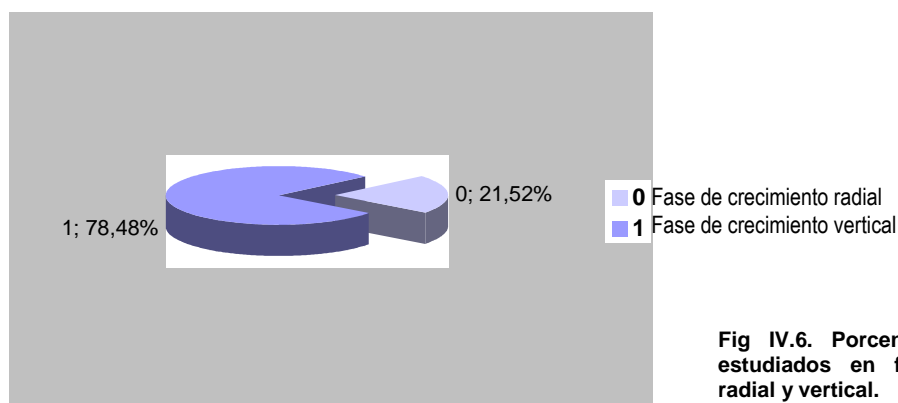


El tipo más frecuente en nuestra serie, así como en la literatura, es el melanoma de extensión superficial que, en nuestro estudio representa aproximadamente el 47% de los casos. El melanoma lentiginoso acral y el melanoma nodular, aunque menos frecuentes (22.8% y 27.8% respectivamente), se hallan sobre-representados en esta serie con el objetivo de poder obtener datos representativos y valoraables en estos subtipos de melanomas con un mínimo de casos. El lentigo maligno melanoma es el menos representado: 2.5% de los casos.

1.6 Características pronósticas de los melanomas

1.6.1. Fase de crecimiento de los melanomas

Como ya se ha comentado anteriormente, una de las características histopatológicas más destacables del melanoma es su peculiar patrón de crecimiento, que se define en fases: radial, vertical y metástasis. Este tipo de progresión secuencial resulta especialmente interesante desde el punto de vista biológico puesto que representa un importante factor pronóstico; en nuestro estudio lo hemos tomado como punto de referencia, centrándonos además, únicamente en melanomas primarios.



El 78.5% de los melanomas incluidos en el estudio corresponden a melanomas en fase de crecimiento vertical, y el 21.5 % a melanomas en fase de crecimiento radial (**Figura IV.6**).

1.6.2. Espesor de Breslow

La media del espesor de Breslow de todos los melanomas seleccionados es de 4.9 mm. El 27.8% presentan un espesor de Breslow < 1 mm; el 19.0% entre ≥ 1 mm y ≤ 2 mm; y el 53.2% de los melanomas > 2 mm (**Figura IV.7**).

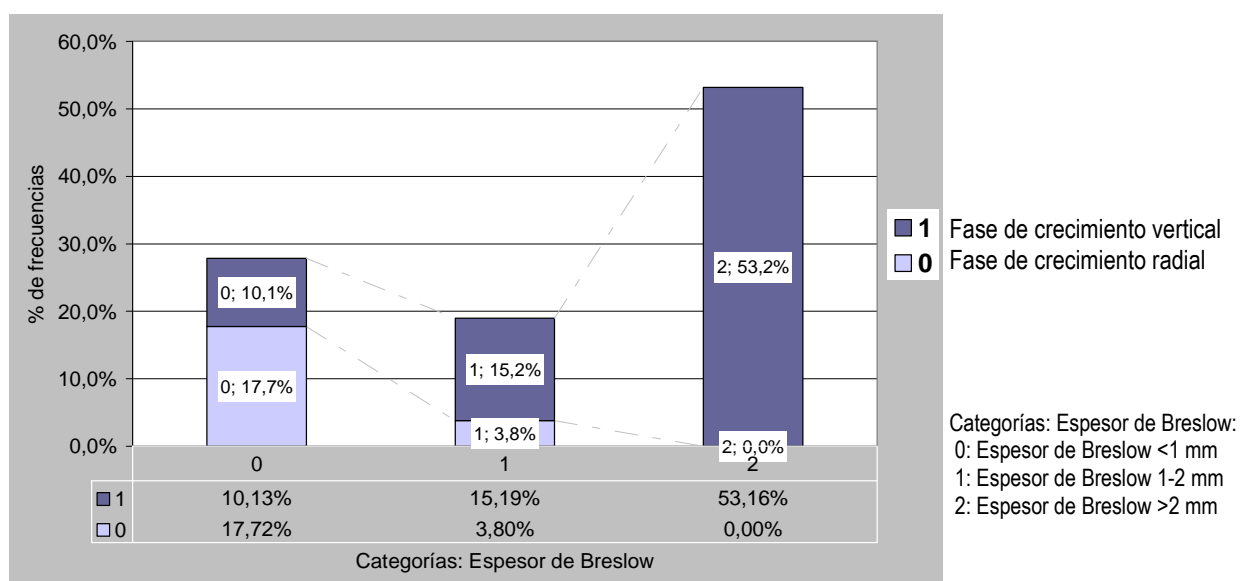


Fig IV.7. % de melanomas según el Espesor de Breslow (y según la fase de crecimiento radial/vertical) del melanoma

La mayoría de los melanomas con un espesor de Breslow < 1 mm se encuentran en fase de crecimiento radial (63.6%), mientras que todos los melanomas con un espesor de Breslow > 2 mm son melanomas en fase de crecimiento vertical (100%).

1.6.3. Nivel de Clark

Los niveles de Clark también representan un factor pronóstico en el melanoma. En nuestra serie de melanomas se obtuvieron los siguientes resultados: la mayoría de los melanomas primarios presentaban en un nivel III o IV de Clark (63.3%); el 17.7% en un nivel II, el 8.9% en un nivel V, y el 3.8% en un nivel I de Clark (**Figura IV.8**).

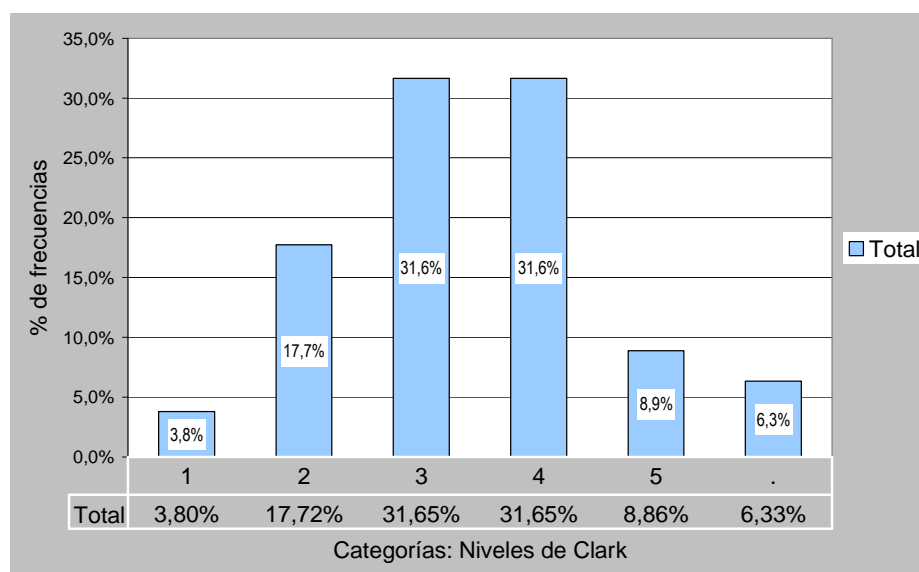


Fig IV.8. Niveles de Clark en nuestra serie de melanomas

Codificación de las categorías: 1: nivel I; 2: nivel II; 3: nivel III; 4: nivel IV; 5: nivel V de Clark; .: no dato

1.6.4. Ulceración

La presencia de ulceración en el melanoma como factor pronóstico ha sido extensamente comprobada (139,140). En nuestra serie, el 29,1% de los casos presentaban ulceración y, el 41,7% no presentaban ulceración; en el 29,1% de los casos no se obtuvo el dato (Tabla IV.2).

ULCERA	N	% (N/ TOTAL)
NO	33	41.8%
SI	23	29.1%
No dato	23	29.1%
Total	79	100%

Tabla IV.2. Variable "ulceración" en la serie de melanomas

1.6.5. Metástasis

La presencia de metástasis, es un factor pronóstico independiente, de modo que por sí mismo cambia la estadificación: hace pasar de un estadio I o II a un estadio III (si existe metástasis ganglionar) o IV (si metástasis no ganglionar: cutánea o visceral). En nuestro estudio, el 55,7% de los casos no presentaban metástasis mientras que el 44,3% de los casos presentaron metástasis en el momento de la selección de los mismos (Tabla IV.3).

METÁSTASIS	N	% (N/TOTAL)
NO/ No dato	44	55.7%
SI	35	44.3%
Total	79	100%

Tabla IV.3. Variable "metástasis" en la serie de melanomas

Atendiendo a la peculiar forma de progresión del melanoma, la fase de crecimiento radial es aquella en la que el potencial metastático es prácticamente nulo, y en la fase de crecimiento vertical el tumor adquiere la capacidad de metastatizar (121,124) (**Tabla IV.4**):

METÁSTASIS	FASE DE CRECIMIENTO		TOTAL N (%)
	Radial	Vertical	
NO/ No dato	17 (100%)	27 (43.6%)	44 (55.7%)
Si	0 (0%)	35 (54.4%)	35 (44.3%)
Total (N)	17 (100%)	62 (100%)	79 (100%)

Tabla IV.4. Variable “metástasis” en función de la fase de crecimiento

1.7. Estatus del paciente en casos de melanoma

Entre las variables clínicas recogidas, también se registró el estatus en el momento del estudio. La variable se codificó como: 0: exitus por melanoma; 1: vivo; 2: exitus por otra causa (no melanoma); 3: no dato. Los datos obtenidos se resumen en la **Tabla IV.5**.

ESTATUS	N	% (N/Total)
0	21	26.6%
1	48	60.7%
2	4	5%
3	6	7.6%
Total	79	100%

Tabla IV.5. Variable “estatus” en la serie de melanomas

1.8. Otras variables clínicas de los melanomas

Otras variables clínicas de interés en el melanoma son: el fototipo, la profesión (*outdoor*; *indoor*), y los posibles antecedentes familiares.

1.8.1. Fototipo: en la mayoría de la población estudiada (Madrid), el fototipo es 2-3, 26.6% (N=21) y 25.3% (N=20) de los casos, respectivamente. Fototipo 1: 3.8% (N=3), fototipo 4: 13.9% (N=11), no se obtuvo el dato: 30.4% (N=24) de los casos.

1.8.2. Profesión: Establecimos esta variable según exposición /no exposición al sol.

En el 29.1% (N= 23) de los casos existía exposición al sol; en el 44.3% (N=35) no existe exposición al sol. En el 26.6% (N=21), no se obtuvo el dato.

1.8.3. Antecedentes familiares: Existían antecedentes familiares (familiares de 1º grado conocidos) de melanoma en el 6.3% (N=5/79) de los casos, y de nevus displásicos en el 3.8% (N=3/26) de los casos.

2. Características histológicas de las lesiones melanocíticas

2.1. Nevus melanocíticos congénitos

Nuestra serie consta de 11 nevus melanocíticos congénitos, que se caracterizan microscópicamente por una proliferación de melanocitos névicos que forman tecas más o menos amplias y profundas que alcanzan la parte más inferior de la dermis reticular, muchas de ellas localizándose alrededor de los anejos (glándulas sudoríparas y folículos pilosos), y que frecuentemente se localizan disecando las fibras de colágeno de la dermis reticular (**Figura IV.9**).

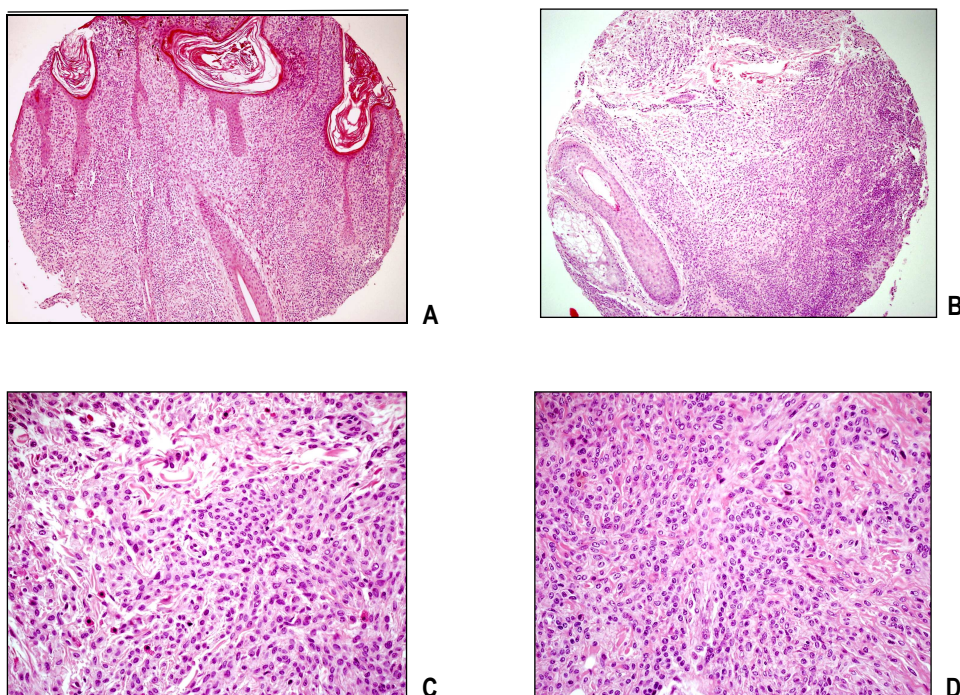


Fig IV. 9. A y B. Dos de los cilindros de nevus congénitos incluidos en el estudio (HE; x100); C y D. A mayor aumento (HE; x400) se observa un importante monomorfismo celular. Se observan las trabéculas celulares entre los haces de colágeno.

2.2. Nevus melanocíticos adquiridos

Para nuestro estudio, se ha seleccionado una serie de 43 nevus melanocíticos adquiridos, que incluyen nevus melanocíticos compuestos (6 cilindros) e intradérmicos (37 cilindros). Se ha evitado incluir nevus melanocíticos junturales, que, en general, presentan menos volumen de melanocitos proliferantes. Además, los nevus melanocíticos compuestos e intradérmicos se han considerado dentro de un mismo grupo dado que la mayoría de las células névicas de los nevus compuestos se localizan en la dermis y comparten las mismas características histopatológicas y biológicas que los nevus melanocíticos intradérmicos.

Como ya se ha comentado anteriormente, los nevus melanocíticos junturales, compuestos e intradérmicos representan estadios evolutivos distintos de un mismo proceso cuya historia natural se corresponde con su evolución histopatológica. Están constituidos por una proliferación de melanocitos névicos agrupados en tecas o nidos, que se inicia con en la unión dermo-epidérmica, y con el paso del tiempo, los nidos de melanocitos migran hacia la dermis papilar, dando lugar a los nevus melanocíticos compuestos. Posteriormente el componente juntural disminuye y sólo quedan los melanocitos dérmicos, dando lugar al nevus melanocítico intradérmico. La **Figura IV.10** muestra dos ejemplos de nevus melanocíticos adquiridos, intradérmico y compuesto.

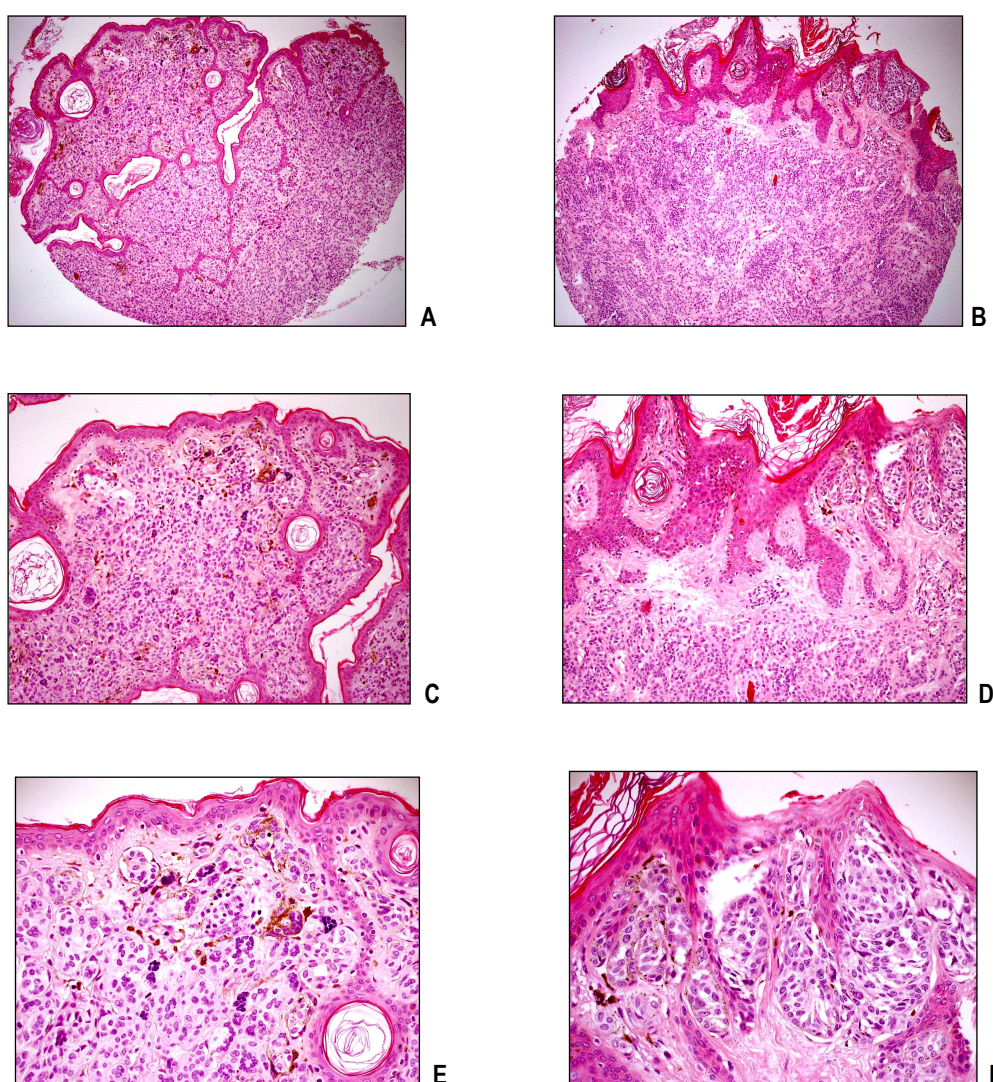


Fig IV.10. Dos de los cilindros correspondientes a nevus melanocíticos adquiridos comunes: A,C,E: Nevus melanocítico intradérmico; B, D, F: Nevus melanocítico compuesto (HE; x100, x200, y x400 respectivamente). En general estas lesiones no constituyen un problema diagnóstico, puesto que se trata de una lesión simétrica, y que pese a su alta densidad celular no presenta atipia, ni mitosis. E, el caso de los nevus compuestos, el componente juntural, muestra en general células de mayor tamaño, aunque sin rasgos de atipia.

2.3. Nevus displásicos

Incluimos una serie de 26 nevus melanocíticos displásicos, que se caracterizan histológicamente por cumplir con los dos criterios histopatológicos previamente establecidos por *Rhodes et al.* (76) (**Figura IV.11**):

1. “Atipia” arquitectural: los nevus displásicos muestran característicamente en el componente juntural un incremento del número de melanocitos aislados y pequeños nidos de melanocitos predominantemente en las puntas y los laterales de las crestas de las papilas, con algunos puentes uniendo las crestas. Las crestas tienden a ser uniformes e irregularmente alargadas.

2. Atipia citológica: en los nevus displásicos es característico observar cierta atipia citológica aleatoria. La atipia se caracteriza por agrandamiento nuclear con ligera irregularidad e hipercromasia, y a veces con nucleolo prominente.

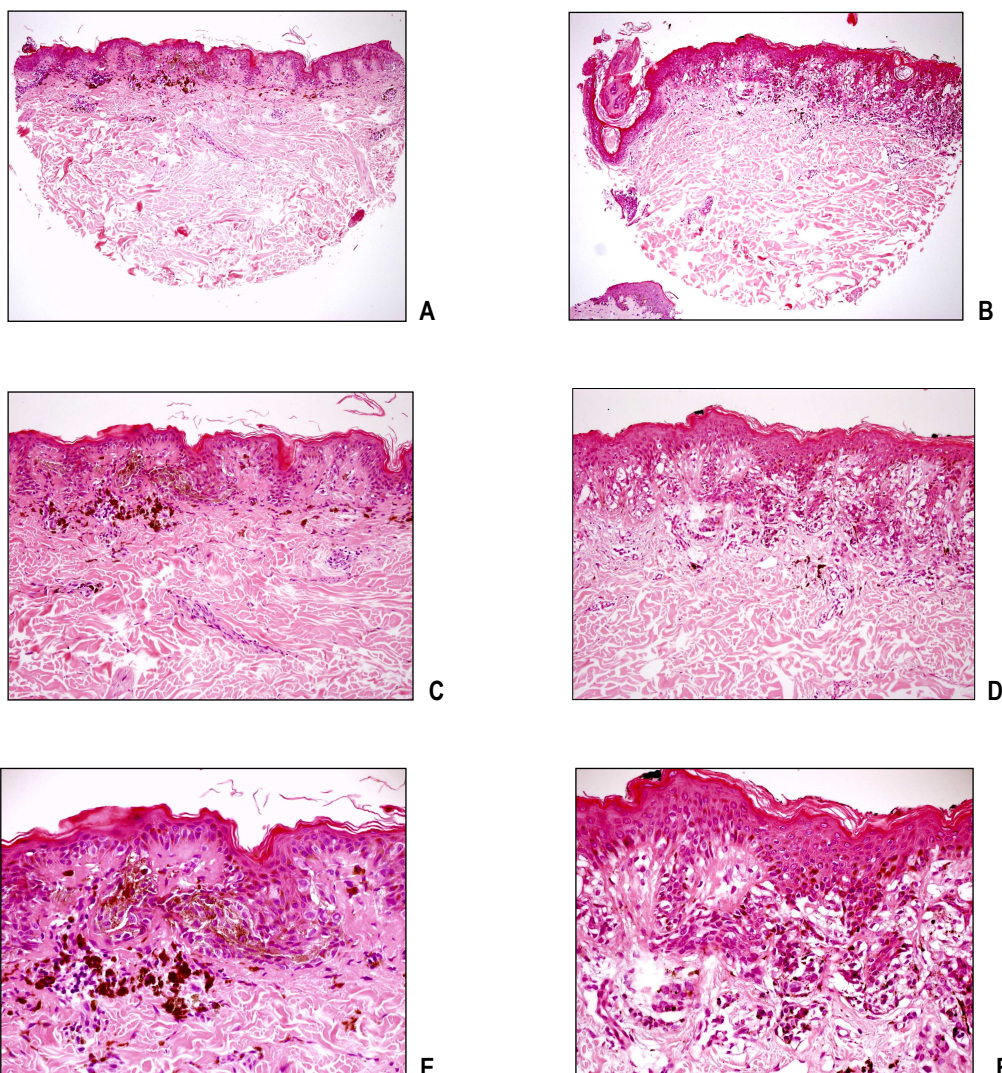


Fig IV.11. Dos de los cilindros correspondientes a nevus displásicos incluidos en nuestro estudio. Se trata de un nevus juntural (A, C, E) o compuesto (B, D, F), constituido de melanocitos aislados o en pequeños nidos que contribuyen a la fusión de las bases de las crestas elongadas. En dermis superficial frecuentemente se observa un discreto infiltrado linfocitario sin signos de regresión. El diagnóstico de nevus displásico se basa en la determinación de atipia melanocítica asociada, más o menos llamativa (H&E; x100, x200, x400 en cada fila respectivamente).

2.4. Nevus de Spitz

La serie de 28 nevus de Spitz se caracteriza por una proliferación de melanocitos névicos, más grandes que los de los nevus melanocíticos adquiridos. Estos melanocitos suelen presentar una morfología epitelioides o fusiforme. Entre nuestros casos predominan los nevus de Spitz con morfología epitelioides, y la mayoría de ellos presentan cierto componente juntural. Raramente se observa extensión pagetoide de los melanocitos individuales dentro de la epidermis. Y, en ninguno de nuestros casos se han observado mitosis (**Figura IV.12**).

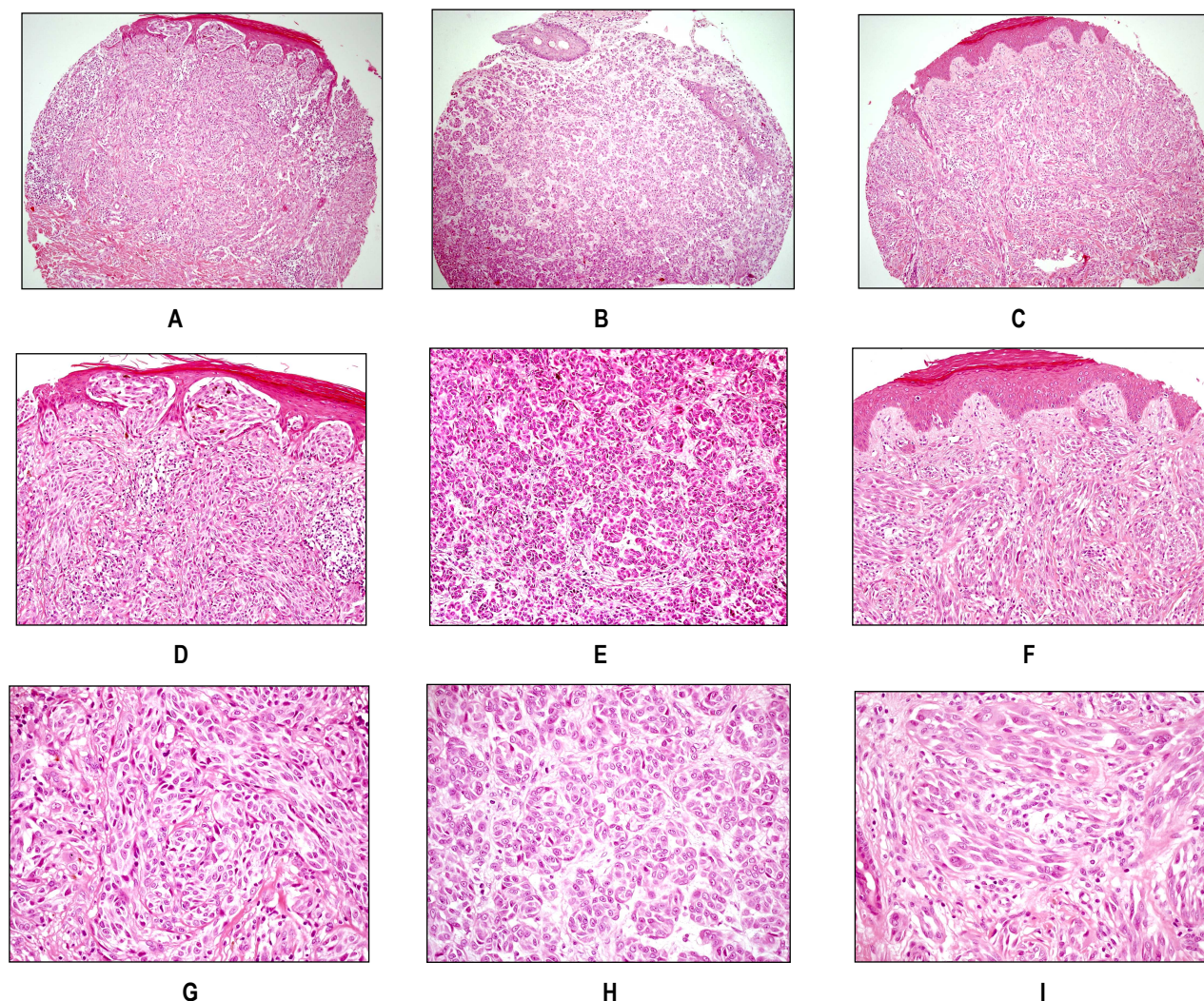


Fig IV.12. Tres de los cilindros de nevus de Spitz incluidos en nuestra serie. El cilindro de la primera columna (A, D, G) muestra una morfología epitelioides y fusiforme con predominio de la células epitelioides, con tecas celulares distribuidas a lo largo de la unión dermo-epidérmica, y también intra-dérmicas, con igual densidad celular en toda la lesión. En el cilindro de la 2ª columna (B, E, H), el nevus de Spitz muestra una morfología más epitelioides, con importante monomorfismo celular. El cilindro de la 3ª columna (C, F, I) muestra un patrón más fusiforme, con células fusiformes dispuestas en tecas irregularmente orientadas, con densidad celular homogénea y sin atipia llamativa. (Imágenes H&E; x100, x200 y x400 en cada fila respectivamente)

2.5. Melanomas en fase de crecimiento radial

Nuestro estudio incluye una serie representativa, de 17 casos de melanomas en fase de crecimiento radial, para comparar los resultados con los obtenidos en los nevus. La peculiar forma de progresión tumoral dicotomiza la historia natural del melanoma en dos fases: fase de crecimiento radial, y vertical, que se definen de acuerdo a unos criterios microscópicos establecidos en la literatura (121,122). En la fase de crecimiento radial, el melanoma es intraepidérmico o microinvasivo y está compuesto por células tumorales aisladas dentro de la epidermis o en pequeños nidos de menos de 15 células en dermis papilar. No se observan figuras de mitosis en el compartimiento infiltrante. Con frecuencia se asocia un denso infiltrado linfoplasmocitario (**Figura IV.13**).

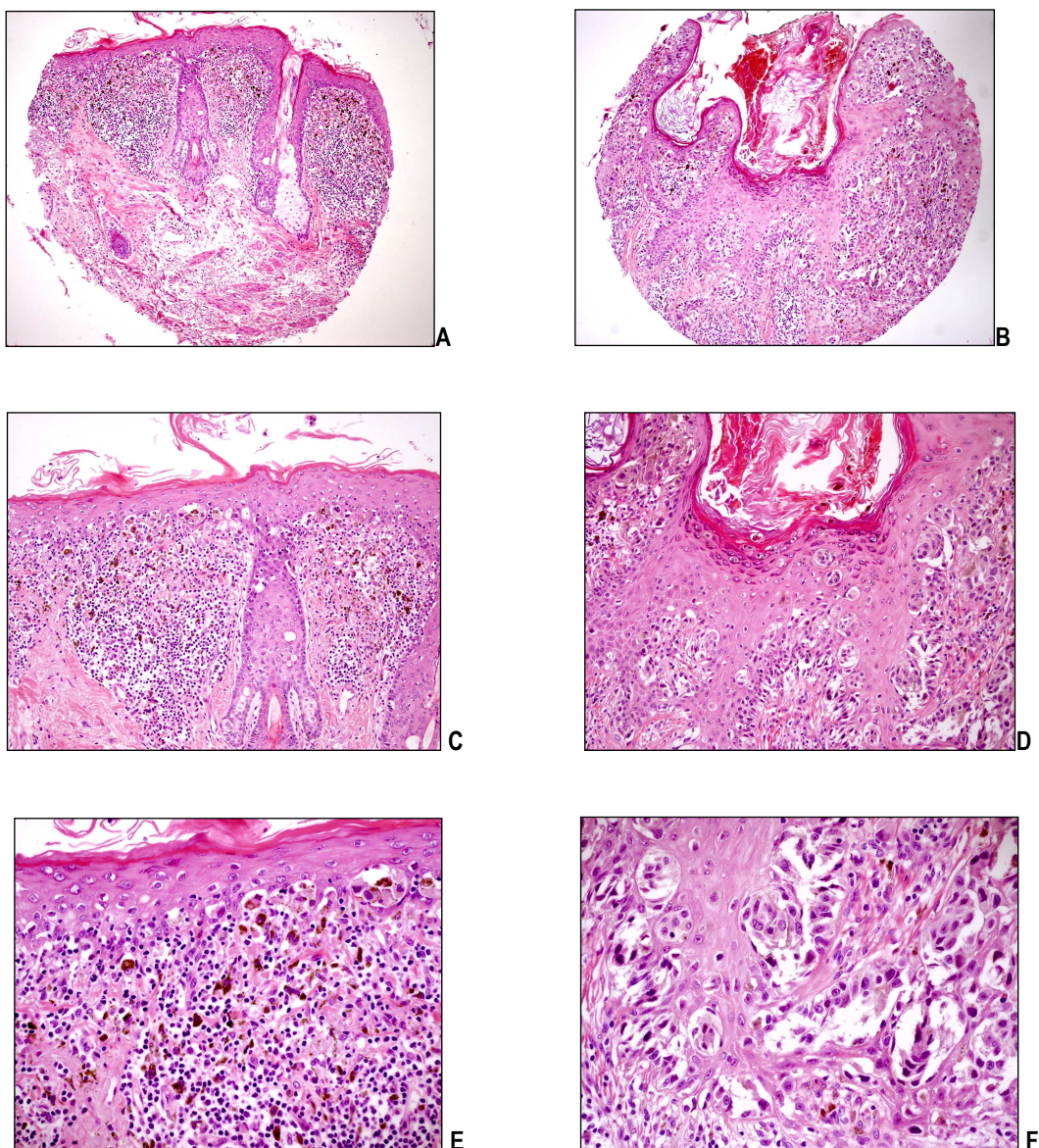


Fig IV.13. Dos de los cilindros correspondientes a melanomas en fase de crecimiento radial incluidos en nuestro estudio (1º cilindro: figuras A, C, E; 2º cilindro: figuras B, D, F). La imagen histológica del melanoma en fase de crecimiento radial puede ser muy variable, aunque siempre mostrando asimetría de la lesión, asimetría en la distribución del pigmento, y en la distribución de la respuesta inflamatoria, atipia citológica, y en general se acompaña de epidermotropismo de melanocitos sueltos o en pequeños grupos (Imágenes H&E; x100, x200, x400 en cada fila respectivamente).

2.6. Melanomas en fase de crecimiento vertical

Nuestro estudio incluye 62 cilindros correspondientes a melanomas en fase de crecimiento vertical. Consideramos que un melanoma está en fase de crecimiento vertical, si invade la dermis reticular o si ocupa la dermis papilar en forma de nidos expansivos de más de 15 células, o de mayor tamaño que aquellos presentes en la epidermis (121) (**Figura IV.14**). Las células tumorales suelen presentar pleomorfismo, con abundantes imágenes de apoptosis. Las mitosis son frecuentes. Existe un subtipo histológico de melanoma, el melanoma nodular en el que no se identifica la fase de crecimiento radial, asumiendo que tiene capacidad metastásica desde el principio.

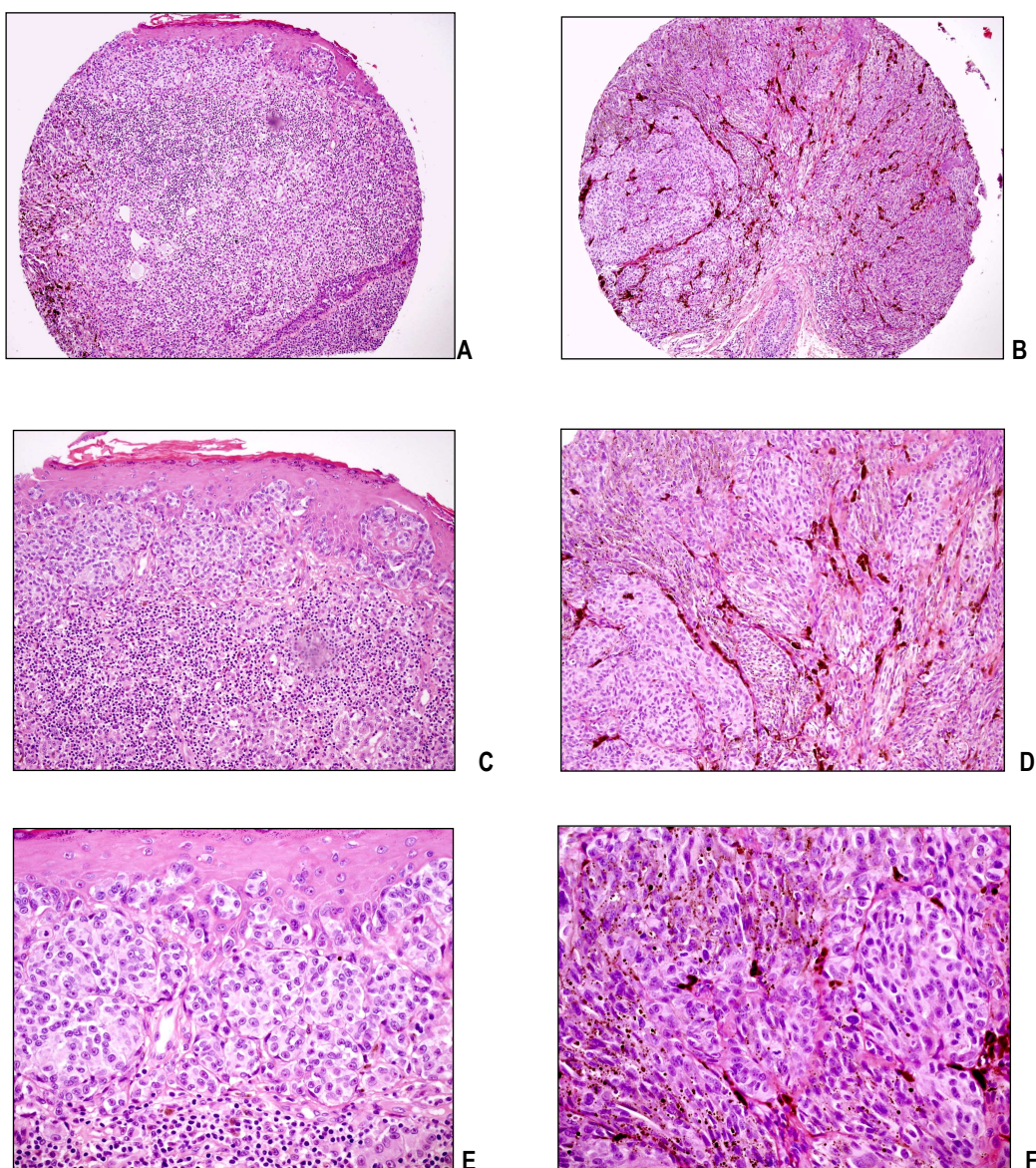


Fig IV.14. Dos de los cilindros de melanomas en fase de crecimiento vertical incluidos en nuestro estudio. El 1º cilindro (Figuras A, C, E) corresponde a una zona superficial del melanoma constituido por células epitelioides, con grandes tecas coalescentes, e imágenes de extensión pagetoide. El 2º cilindro (Figuras B, D y F) corresponde a una zona profunda del melanoma en fase de crecimiento vertical constituido por células de morfología fusiforme, con intensa atipia y distribución irregular del pigmento. (Imágenes H&E; x100, x200, x400 en cada fila respectivamente).

3. Características inmunohistoquímicas de las lesiones melanocíticas: análisis descriptivo y comparativo

Se analizan 23 marcadores moleculares mediante técnicas de inmunohistoquímica en los cortes realizados sobre los bloques de TMA en una serie de 187 lesiones melanocíticas benignas y malignas.

En la **Tabla IV.6**, se recoge el número de cilindros interpretables de la serie para cada tipo de lesión, y las características inmunohistoquímicas de esta serie.

	Nevus congénito	Nevus intradérmico / compuesto	Nevus de Spitz	Nevus displásico	Melanoma radial	Melanoma vertical	Total	Casos positivos
Proteínas específicas								
HMB 45	11	42	27	25	15	62	182	109 (60%)
Melan A	11	42	27	25	15	62	182	175 (96%)
S-100	11	42	27	24	17	62	182	182 (100%)
Ciclo celular								
Ciclina D1	11	42	23	25	16	61	178	54 (30%)
CDK4	11	43	21	.	.	.	75	0 (0%)
p16	10	43	26	26	16	62	183	174 (95%)
p21	11	43	23	23	16	62	179	53 (30%)
p53	11	42	26	23	17	62	181	97 (54%)
Rb	11	43	26	25	16	62	183	82 (45%)
Apoptosis								
Survivina	11	43	26	24	17	61	182	42 (26%)
Estabilidad ADN								
MLH-1	11	42	28	23	14	62	180	174 (97%)
MSH-2	11	42	26	24	17	61	181	178 (98%)
Marcadores proliferación								
Ki 67	11	42	27	25	17	62	184	24 (13%)
Receptores de membrana								
Caveolina	11	42	26	23	16	62	180	108 (60%)
c-kit	11	40	26	23	16	62	178	48 (27%)
Transición epitelio-mesénquima								
Cadherina E	11	42	25	23	17	62	180	115 (64%)
Cadherina N	11	42	24	23	.	47	147	18 (12%)
SPARC	11	42	26	23	.	53	155	69 (45%)
Osteopon.	9	42	27	24	.	48	150	61 (41%)
PKCa	10	43	26	24	.	54	157	74 (47%)
WT1	11	42	24	24	17	62	180	84 (47%)
Otras								
HLA	11	41	25	25	14	62	178	8 (4%)
Topoisom.	11	42	26	23	17	62	181	61(34%)

Tabla IV.6. Cilindros interpretables en la serie de 187 lesiones melanocíticas benignas y malignas.

3.1. Características inmunohistoquímicas de los nevus congénitos y de los nevus adquiridos.

Las características inmunohistoquímicas de los nevus congénitos y nevus adquiridos compuestos e intradérmicos se muestran a continuación en la **Tabla IV.7**.

	N. congénito				N. intradérmico-compuesto	
	c/to	%(+)C	p (C/I)	p(C/I)*	c/to	%(+)I
Proteínas específicas						
HMB 45	0/11	0%	1.000	1.000	0/42	0%
Melan A	11/11	100%	1.000	1.000	42/42	100%
S-100	11/11	100%	1.000	1.000	42/42	100%
Proteínas ciclo celular						
Ciclina D1	0/11	0%	1.000	1.000	2/42	5%
CDK4	0/11	0%	1.000	1.000	0/43	0%
p16	10/10	100%	1.000	1.000	42/43	98%
p21	0/11	0%	1.000	1.000	2/43	5%
p53	0/11	0%	0.322	0.652	7/42	17%
Rb	0/11	0%	1.000	1.000	2/43	5%
Apoptosis						
Survivina	0/11	0%	1.000	1.000	0/43	0%
Estabilidad ADN						
MLH-1	11/11	100%	1.000	1.000	42/42	100%
MSH-2	11/11	100%	1.000	1.000	39/42	93%
Marcador proliferación						
Ki 67	0/11	0%	1.000	1.000	0/42	0%
Receptores de membrana						
Caveolina	11/11	100%	1.000	1.000	42/42	100%
c-kit	0/11	0%	1.000	1.000	1/40	3%
Transición epitelio-mesénquima						
Cadherina E	5/11	45%	0.478	0.876	13/42	31%
Cadherina N	0/11	0%	1.000	1.000	0/42	0%
SPARC	0/11	0%	1.000	1.000	0/42	0%
Osteopon.	0/9	0%	0.575	0.990	6/42	14%
PKCα	9/10	90%	0.189	0.419	43/43	100%
WT1	1/11	9%	0.000	0.000	29/42	69%
Otras						
HLA	0/11	0%	1.000	1.000	1/41	2%
Topoisom.	0/11	0%	1.000	1.000	1/42	2%

Tabla IV.7. Características inmunohistoquímicas de los nevus congénitos y nevus melanocíticos adquiridos compuestos e intradérmicos, y comparación de ambos valores. Los datos reflejan el número de casos positivos del total (c/to), el porcentaje correspondiente (%), y el valor de la significancia (valor p y p corregida). Los resultados que han resultado significativos están marcados en rojo. C, congénitos; I, intradérmicos.

Recordamos, que en este estudio, los nevus melanocíticos compuestos e intradérmicos se consideran juntos, dentro de un mismo grupo.

* La proteína S-100, muy sensible (100% de expresión tanto en nevus congénitos como en nevus adquiridos), y HMB-45 y Melan-A, marcadores más específicos de lesiones melanocíticas, muestran el mismo nivel de expresión en nevus congénitos y nevus adquiridos (100% de expresión de Melan-A y 0% de expresión de HMB-45).

* Las proteínas del ciclo celular muestran también niveles similares de expresión tanto

en nevus congénitos como en nevus adquiridos. Se caracterizan por un nivel bajo de expresión en las proteínas coordinadoras de la progresión del ciclo celular (quinasas dependientes de ciclinas, ciclina D1, y el regulador del complejo ciclina D/CDK, p21), y un alto nivel del inhibidor de la CDKs, p16 (98-100%). Las proteínas p53 y Rb no se expresan en nevus congénitos (0%), y escasamente en nevus adquiridos comunes (17% y 5% respectivamente).

* La survivina, proteína implicada en la inhibición de la apoptosis no muestra expresión (0%) en nevus congénitos, ni en nevus adquiridos (**Figura IV.15**).

* Las proteínas que intervienen en uno de los mecanismos de reparación del ADN (MLH-1 y MSH-2) muestran intensa positividad (93%-100%) tanto en nevus congénitos como en nevus intradérmicos-compuestos (**Figura IV.15**).

* Ni los nevus congénitos ni los nevus adquiridos muestran expresión del Ki-67, marcador de proliferación (0% de expresión).

* Tampoco existen diferencias significativas en los niveles de expresión en los receptores de membrana: caveolina y c-kit, que muestran intensa positividad del 100% para la caveolina, tanto en nevus congénitos como en los adquiridos, y negatividad (0%) para c-kit en ambos.

* Las proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima muestran también niveles de expresión similares en nevus congénitos y en nevus melanocíticos adquiridos, salvo para la proteína WT1. Se observa moderada positividad frente a la cadherina E (45% y 31% en nevus congénitos y nevus adquiridos respectivamente), negatividad (0%) en ambos tipos de nevus para cadherina N, osteonectina/SPARC y osteopontina, y positividad para PKC α (90% y 100% en nevus congénitos y nevus adquiridos respectivamente). La proteína **WT1**, que se describió inicialmente como gen supresor en el tumor de Wilms y que actualmente se implica cada vez más en la transición epitelio-mesénquima de algunos tumores, muestra escasa reactividad en nevus congénitos (9%) y marcada en nevus adquiridos (69%), con diferencia significativa ($p=0.000$).

* Otras proteínas estudiadas como HLA y topoisomerasa muestran escasa/nula reactividad (0% y 2% en nevus congénitos y nevus adquiridos respectivamente) en ambos tipos de nevus (**Figura IV.15**).

En resumen, tanto los nevus congénitos como los adquiridos presentan niveles similares de expresión de los marcadores estudiados, y se caracterizan por un nivel bajo de la proteínas del ciclo celular y del índice de proliferación (Ki67); mantenimiento de los niveles de las proteínas de membrana (caveolina y c-kit); de los marcadores la transición epitelio-mesénquima; y de los marcadores de la estabilidad de ADN (MLH-1, y MSH-2).

3.2. Características inmunohistoquímicas de los nevus displásicos

Las características inmunohistoquímicas de los nevus displásicos se describen a continuación en la **Tabla IV.8**. Siguiendo en modelo de progresión tumoral por etapas

propuesto por Clark en el melanoma (121), en este estudio empiezan a observarse diferencias de expresión en proteínas aisladas.

	N. intradérmico-compuesto				N. displásico	
	c/to	%(+)	p (I/D)	p(I/D)*	c/to	%(+) D
Proteína específicas						
HMB 45	0/42	0%	0.000	0.000	23/25	92%
Melan A	42/42	100%	1.000	1.000	25/25	100%
S-100	42/42	100%	1.000	1.000	24/24	100%
Ciclo celular						
Ciclina D1	2/42	5%	0.000	0.000	17/25	68%
CDK4	0/43	0%				
p16	42/43	98%	1.000	1.000	26/26	100%
p21	2/43	5%	0.001	0.004	9/23	39%
p53	7/42	17%	0.221	0.486	7/23	30%
Rb	2/43	5%	0.091	0.221	5/25	20%
Apoptosis						
Survivina	0/43	0%	1.000	1.000	0/24	0%
Estabilidad ADN						
MLH-1	42/42	100%	1.000	1.000	23/23	100%
MSH-2	39/42	93%	0.295	0.617	24/24	100%
Índice proliferación						
Ki 67	0/42	0%	1.000	1.000	0/25	0%
Receptores de membrana						
Caveolina	42/42	100%	0.001	0.004	17/23	74%
c-kit	1/40	3%	0.000	0.000	18/23	78%
Transición epitelio-mesénquima						
Cadherina E	13/42	31%	0.000	0.000	23/23	100%
Cadherina N	0/42	0%	1.000	1.000	0/23	0%
SPARC	0/42	0%	0.000	0.000	21/23	91%
Osteopon.	6/42	14%	1.000	1.000	3/24	13%
PKCα	43/43	100%	0.000	0.000	10/24	42%
WT1	29/42	69%	0.002	0.007	7/24	29%
Otras						
HLA	1/41	2%	1.000	1.000	0/25	0%
Topoisom.	1/42	2%	0.049	0.126	4/23	17%

Tabla IV.8. Características inmunohistoquímicas de los nevos displásicos, y comparación (análisis de contingencia) con los nevos adquiridos. I, intradérmicos; D, displásicos.

* Los marcadores de diferenciación melanocítica (proteína S-100 y Melan-A) muestran una intensa positividad (100%) tanto para nevos adquiridos comunes como para nevos displásicos, mientras que el HMB-45 muestra importante positividad en nevos displásicos (positividad del 92%), y negatividad en nevos intradérmicos (0% de reactividad; $p/I/D < 0.05$).

* En relación con las proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, se empiezan a observar diferencias significativas. Se observa, como ya se ha comentado anteriormente, un bajo nivel de expresión para la **ciclina D1** y la proteína **p-21** en nevos intradérmicos (5% para ambas proteínas), y sin embargo, moderada positividad en nevos displásicos (68% y 39% respectivamente; $p < 0.05$). Sin embargo, la proteína p16 muestra altos

niveles de expresión tanto en nevus comunes (98%), como en nevus displásicos (100%) (**Figura IV.15**). Y, las proteínas p53 y Rb no muestran diferencias significativas.

* La survivina muestra negatividad (0%) tanto en nevus intradérmicos como en nevus displásicos (**Figura IV.15**).

* No se observan diferencias en los niveles de expresión de las proteínas implicadas en la reparación del ADN, que muestran intensa positividad (93%-100%) tanto en nevus intradérmicos como en nevus displásicos (**Figura IV.15**).

* El índice de proliferación Ki-67 muestra negatividad (0%) tanto en nevus intradérmicos como en nevus displásicos.

* Cabe destacar la expresión de los receptores de membrana en los nevus displásicos. Se observa una disminución significativa ($p=0.001$) en la expresión de **caveolina** entre los nevus intradérmicos (100%) y los nevus displásicos (74%). También se observa un importante aumento ($p<0.05$) de la expresión de **c-kit** entre los nevus intradérmicos (3%) y los nevus displásicos (78%).

* En relación con las proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima: existe una importante diferencia ($p<0.05$) en la expresión de **cadherina E** entre los nevus intradérmicos (31%) y los nevus displásicos (100%), sin que esta se acompañe de alteración en la expresión de cadherina N (0% tanto en nevus intradérmicos como en nevus displásicos). También se observa una importante positividad para **SPARC/osteonectina** (91%) en nevus displásicos frente a la negatividad observada (0%) en nevus intradérmicos adquiridos ($p<0.05$). Sin embargo, no existe diferencia significativa en la expresión de osteopontina (14% y 13% para nevus intradérmicos y nevus displásicos respectivamente) (**Figura IV.15**). Se observa una marcada disminución ($p<0.05$) en la expresión de **PKC α** y **WT1** en los nevus displásicos (42% y 29%) frente a los nevus intradérmicos (100% y 69% respectivamente).

* Otras proteínas estudiadas: la expresión de HLA es escasa tanto en nevus intradérmicos (2%) como en nevus displásicos (0%). Y se observa aumento en la expresión de **topoisomerasa** en nevus displásicos (17%) frente a nevus intradérmicos (2%).

3.3. Características inmunohistoquímicas de los nevus de Spitz

3.3.1. Características inmunohistoquímicas de los nevus de Spitz y comparación con nevus adquiridos intradérmicos/compuestos y displásicos.

En la siguiente tabla (**Tabla IV.9**) se exponen las características inmunohistoquímicas de los nevus de Spitz, una variedad particular de nevus adquirido, y se comparan a su vez con los nevus adquiridos comunes y los nevus displásicos.

Los nevus de Spitz presentan características inmunohistoquímicas únicas en el grupo de las lesiones melanocíticas benignas, diferentes de los nevus adquiridos comunes, y de los nevus displásicos.

	N. intradérmico-compuesto				N. Spitz				N. displásico	
	c/to	%(+)I	p (I/S)	p (I/S)*	c/to	%(+)S	p (S/D)	p (S/D)*	c/to	%(+)D
Proteínas específicas										
HMB 45	0/42	0%	0.000	0.000	12/27	44%	0.000	0.000	23/25	92%
Melan A	42/42	100%	0.391	0.744	26/27	96%	1.000	1.000	25/25	100%
S-100	42/42	100%	1.000	1.000	27/27	100%	1.000	1.000	24/24	100%
Ciclo celular										
Ciclina D1	2/42	5%	0.000	0.000	17/23	74%	0.756	1.000	17/25	68%
CDK4	0/43	0%	1.000	1.000	0/21	0%				
p16	42/43	98%	1.000	1.000	26/26	100%	1.000	1.000	26/26	100%
p21	2/43	5%	0.000	0.000	21/23	91%	0.000	0.000	9/23	39%
p53	7/42	17%	0.000	0.000	20/26	77%	0.002	0.007	7/23	30%
Rb	2/43	5%	0.000	0.000	17/26	65%	0.002	0.007	5/25	20%
Apoptosis										
Survivina	0/43	0%	1.000	1.000	0/26	0%	1.000	1.000	0/24	0%
Estabilidad ADN										
MLH-1	42/42	100%	1.000	1.000	28/28	100%	1.000	1.000	23/23	100%
MSH-2	39/42	93%	0.281	0.602	26/26	100%	1.000	1.000	24/24	100%
Índice proliferación										
Ki 67	0/42	0%	1.000	1.000	0/27	0%	1.000	1.000	0/25	0%
Receptores de membrana										
Caveolina	42/42	100%	0.000	0.000	16/26	62%	0.382	0.738	17/23	74%
c-kit	1/40	3%	0.292	0.616	3/26	12%	0.000	0.000	18/23	78%
Transición epitelio-mesénquima										
Cadherina E	13/42	31%	0.000	0.000	21/25	84%	0.111	0.262	23/23	100%
Cadherina N	0/42	0%	0.005	0.015	5/24	21%	0.050	0.127	0/23	0%
SPARC	0/42	0%	0.000	0.000	25/26	96%	0.594	1.000	21/23	91%
Osteopon.	6/42	14%	0.000	0.000	18/27	67%	0.000	0.000	3/24	13%
PKCα	43/43	100%	0.377	0.745	25/26	96%	0.000	0.000	10/24	42%
WT1	29/42	69%	0.599	1.000	15/24	63%	0.041	0.110	7/24	29%
Otras										
HLA	1/41	2%	0.552	0.957	2/25	8%	0.490	0.886	0/25	0%
Topoisom.	1/42	2%	0.067	0.166	4/26	15%	1.000	1.000	4/23	17%

Tabla IV.9. Características inmunohistoquímicas de los nevus de Spitz y comparación con los nevus adquiridos y los nevus displásicos. I, intradérmicos; S, Spitz; D, displásicos.

* En relación con las proteínas específicas de las lesiones melanocíticas: la proteína S-100 y Melan-A muestran una intensa positividad (100%) tanto para nevus de Spitz, como para nevus adquiridos comunes, y para nevus congénitos, mientras que el **HMB-45** muestra negatividad en nevus intradérmicos (0% de reactividad), frente a moderada expresión ($p/I/S < 0.05$) en nevus de Spitz (44%, especialmente en el componente intraepidérmico) que, a su vez, también muestra una diferencia significativa ($p/S/D < 0.05$) frente a nevus displásicos que muestran una expresión mayor (92%).

* Proteínas del ciclo celular:

Frente a nevus melanocíticos intradérmicos comunes: se observa una diferencia significativa ($p/I/S < 0.05$) en la expresión de **ciclina D1**, que muestra una positividad del 74% en nevus de Spitz frente al 5% en nevus adquiridos (intradérmicos/compuestos) y en la expresión

de **p21**, **p53** y **Rb** que también muestran una alta expresión en nevus de Spitz (91%, 77%, 65% respectivamente). No se observan diferencias significativas para CDK4 (que no se expresa ni en nevus intradérmicos ni en nevus de Spitz), ni para p16 (positividad del 98% y 100% respectivamente en nevus intradérmicos y en nevus de Spitz) (**Figura IV.15**).

Frente a los nevus displásicos, no se observan diferencias ni para ciclina D1 (74% en nevus de Spitz frente a 68% en nevus displásicos), ni para p16 (100% en ambos). Sin embargo se observan diferencias significativas ($pS/D < 0.05$) en la expresión de **p21**, **p53** y **Rb**, que muestran una intensa positividad en nevus de Spitz (frente a una ligera-moderada expresión en nevus displásicos: 39%, 30% y 20% respectivamente).

* La proteína inhibidora de la apoptosis, survivina muestra una expresión similar (0%) tanto en nevus de Spitz como en nevus intradérmicos y displásicos.

* En relación con las proteínas de reparación de ADN, se observa intensa expresión de MLH-1, y de MSH-2 tanto en nevus de Spitz (100% en ambos), como en nevus intradérmicos, y displásicos (**Figura IV.15**).

* Ki-67: No se observa aumento de índice de proliferación (0%) en nevus de Spitz frente a nevus adquiridos, ni frente a nevus displásicos.

* Las proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima parecen jugar un importante papel en la evolución de los nevus de Spitz:

Frente a nevus melanocíticos intradérmicos-compuestos: se observa una alta reactividad frente a **cadherina E**, **cadherina N**, **osteonectina/SPARC** y **osteopontina** (84%, 21%, 96% y 67% respectivamente) en nevus de Spitz, que muestran una diferencia significativa ($pI/S < 0.05$) frente a la escasa reactividad de dichos marcadores en nevus adquiridos comunes (31%, 0%, 0%, 14% respectivamente). No se observan diferencias significativas en la expresión de PKC α , ni de WT1 (96% y 63% respectivamente en nevus de Spitz).

Frente nevus displásicos: existen una importante diferencia ($pS/D < 0.05$) en la expresión de **osteopontina** y **PKC α** que muestran una importante positividad en nevus de Spitz (67%, 96% respectivamente) frente a nevus displásicos (13% y 42% respectivamente), con una marcada tendencia a la mayor expresión de cadherina N y WT1 en nevus de Spitz (21y 67% frente a 0% y 29% en nevus displásicos). Sin embargo, en ambos tipos de nevus se observa una importante expresión de cadherina E, y de SPARC/osteonectina (**Figura IV.15**).

* En relación con otros marcadores estudiados como HLA y topoisomerasa, no se observan importantes diferencias, observándose una ligera expresión tanto en nevus de Spitz (8% y 15% respectivamente), como en nevus comunes (2% para HLA y Topoisomerasa) y nevus displásicos (0% de expresión para HLA, y 17% para Topoisomerasa) (**Figura IV.15**).

3.3.2. Expresión de marcadores proteicos en nevus de Spitz frente a melanomas

La siguiente **Tabla IV.10** muestra la expresión de los 23 marcadores moleculares en nevus de Spitz y en melanomas.

	N. Spitz				Mel. Radial				Mel. vertical			
	c/to	%(+) ^S	p (S/R)	p (S/R)*	c/to	%(+) ^R	p(R/V)	p(R/V)*	c/to	%(+) ^V	p (S/V)	p (S/V)*
Proteínas específicas												
HMB 45	12/27	44%	0.000	0.000	15/15	100%	1.000	1.000	59/62	95%	0.000	0.000
Melan A	26/27	96%	1.000	1.000	14/15	93%	1.000	1.000	57/62	92%	0.663	1.000
S-100	27/27	100%	1.000	1.000	17/17	100%	1.000	1.000	62/62	100%	1.000	1.000
Ciclo celular												
Ciclina D1	17/23	74%	0.179	0.401	8/16	50%	0.008	0.024	10/61	16%	0.000	0.000
CDK4	0/21	0%
p16	26/26	100%	0.381	0.744	15/16	94%	1.000	1.000	55/62	89%	0.099	0.237
p21	21/23	91%	0.000	0.000	4/16	25%	1.000	1.000	17/62	27%	0.000	0.000
p53	20/26	77%	1.000	1.000	14/17	82%	1.000	1.000	49/62	79%	1.000	1.000
Rb	17/26	65%	0.733	1.000	12/16	75%	1.000	1.000	46/62	74%	0.443	0.824
Apoptosis												
Survivina	0/26	0%	0.006	0.018	5/17	29%	0.005	0.015	42/62	68%	0.000	0.000
Estabilidad ADN												
MLH-1	28/28	100%	0.009	0.026	10/14	71%	0.003	0.010	61/62	98%	1.000	1.000
MSH-2	26/26	100%	1.000	1.000	17/17	100%	1.000	1.000	61/61	100%	1.000	1.000
Índice proliferación												
Ki 67	0/27	0%	0.386	0.740	1/17	6%	0.016	0.044	23/62	37%	0.000	0.000
Receptores de membrana												
Caveolina	16/26	62%	0.011	0.031	3/16	19%	0.535	0.940	19/62	31%	0.009	0.026
c-kit	3/26	12%	0.000	0.000	14/16	88%	0.000	0.000	17/62	27%	0.163	0.372
Transición epitelio-mesénquima												
Caderina E	21/25	84%	1.000	1.000	15/17	88%	0.044	0.116	38/62	61%	0.046	0.120
Caderina N	5/24	21%	13/47	28%	0.580	0.985
SPARC	25/26	96%	23/53	43%	0.000	0.000
Osteopon.	18/27	67%	34/48	71%	0.796	1.000
PKCα	25/26	96%	26/54	48%	0.000	0.000
WT1	15/24	63%	0.010	0.028	3/17	18%	0.049	0.126	29/62	47%	0.233	0.508
Otras												
HLA	2/25	8%	0.528	0.934	0/14	0%	0.577	0.986	5/62	8%	1.000	1.000
Topoisom.	4/26	15%	0.000	0.000	3/17	76%	1.000	1.000	49/62	79%	0.000	0.000

Tabla IV.10. Características inmunohistoquímicas de los nevos de Spitz y comparación con los melanomas en fase de crecimiento radial y vertical. S; Spitz; R, radial; V, vertical.

* En relación con las proteínas específicas del linaje melanocítico, las proteínas S-100, y Melan-A muestran intensa positividad tanto en nevos de Spitz como en melanomas (independientemente de la fase de crecimiento). Sin embargo, el marcador HMB-45 muestra moderada positividad en los casos de nevos de Spitz (12 casos positivos de 27; 44%), mientras que se observa intensa positividad ($pS/R<0.05$) tanto en melanomas en fase de crecimiento radial (100%) como vertical (95%).

* En relación con las proteínas del ciclo celular: Se observa una diferencia significativa en cuanto a la expresión de **ciclina D1**, que se expresa de forma importante en nevos de Spitz (74%), de forma moderada en melanomas en fase de crecimiento radial (50%), y escasamente en melanomas en fase de crecimiento vertical (16%; $pS/V<0.05$). En relación con las proteínas reguladoras del ciclo, aunque se observa una disminución de la expresión de p16, se mantiene en niveles relativamente altos, sin diferencias significativas (entre 100% en nevos de Spitz y 89% en melanomas en fase de crecimiento vertical); la proteína **p21** muestra una intensa expresión en nevos de Spitz (91%), que se pierde en melanomas en fase de crecimiento radial

(25%; $pS/R<0.05$) y vertical (27%; $pS/V<0.05$). Las proteínas p53 y Rb no muestran diferencias relevantes entre nevus de Spitz y melanomas.

* Por otro lado, mientras que no se observa expresión de la **survivina** en nevus de Spitz (0%), se observa inmunoreactividad hasta en el 29% de los casos (5 de 17) de melanoma en fase de crecimiento radial, y hasta un 69% (42 de 61) de los melanomas en fase de crecimiento vertical ($pS/V<0.05$) (**Figura IV.15**).

* En relación con los marcadores de inestabilidad de microsatélites: MLH-1 muestra una diferencia entre nevus de Spitz (100%) y melanomas en fase de crecimiento radial (71%; $pS/R<0.05$), que no se observa con los melanomas en fase de crecimiento vertical (**Figura IV.15**). La expresión de MSH-2 no muestra diferencias significativas entre nevus de Spitz y melanomas.

* El índice de proliferación valorado mediante **Ki-67**, muestra una expresión nula en nevus de Spitz (0%), y un incremento en su expresión en melanomas en fase de radial (6%; $pS/R<0.05$) y vertical (37%; $pS/V<0.05$).

* Por su parte, la **caveolina**, proteína de membrana, muestra una expresión significativamente mayor ($p<0.05$) en nevus de Spitz (62%) frente a melanomas (radiales 19% y verticales 31%). Y el receptor tirosín-quinasa **c-kit** muestra escasa positividad en nevus de Spitz (12%), y mayor en melanomas en fase de crecimiento radial (88%; $pS/R<0.05$) y en melanomas en fase de crecimiento vertical (27%).

* Las proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima muestran diferencias significativas entre el nevus de Spitz y los melanomas en fase de crecimiento vertical: en nevus de Spitz se observa una intensa expresión de cadherina E (84%), que disminuye en melanomas en fase de crecimiento vertical (61%) sin embargo, la cadherina N muestra una expresión ligera-moderada tanto en nevus de Spitz (21%) como en melanomas verticales (28%) a diferencia de los nevus comunes (ya comentados: 0%). También se observa una intensa expresión de SPARC (96%) y PKC α (96%), frente a una expresión más moderada en melanomas en fase de crecimiento vertical de SPARC (43%; $pS/V=0.000$) y de PKC α (48%; $pS/V=0.000$). Ni la expresión de osteopontina (67% en nevus de Spitz y 71% en melanomas verticales), ni la de WT1 muestran diferencias significativas.

* Otras proteínas estudiadas: HLA no muestran diferencias de expresión entre nevus de Spitz y melanomas. La **topoisomerasa**, un marcador de proliferación celular, muestran escasa reactividad en nevus de Spitz (15%) frente a melanomas en fase radial (76%; $pS/R<0.05$) y vertical (79%; $pS/V<0.05$) (**Figura IV.15**).

En resumen, los nevus de Spitz, son un tipo de proliferación melanocítica único que comparte características moleculares con nevus adquiridos comunes: ambos muestran escasa activación del ciclo celular con escasa expresión de la quinasa dependiente de ciclinas CDK4 e intensa expresión de la proteína p16, escasa expresión de marcadores de proliferación como Ki-67 y topoisomerasa, y también muestran escasa inmunoreactividad para survivina y c-kit. Por otro lado, también comparte características con melanomas en fase de crecimiento vertical:

en relación con la proteínas de la transición epitelio-mesénquima, aunque en el nevus de Spitz se mantiene la expresión de cadherina E, se pierde parcialmente la expresión de cadherina N. Se observa además una alta expresión de SPARC y osteopontina tanto en nevus de Spitz como en melanomas. El nevus de Spitz muestra características únicas como la intensa expresión de p21.

3.4. Comparación de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos en nevus comunes y displásicos con melanomas en fase de crecimiento radial y en fase de crecimiento vertical.

La **Tabla IV.11** muestra los resultados de la expresión de los marcadores estudiados en melanomas primarios en fase de crecimiento radial y en fase de crecimiento vertical, y los compara con los resultados previamente obtenidos en nevus adquiridos comunes y en nevus displásicos.

* Marcadores específicos de lesiones melanocíticas: Se observa una intensa positividad para HMB-45, Melan-A y proteína S-100, en nevus displásicos y en melanomas en fase de crecimiento radial y vertical.

* Proteínas implicadas en el ciclo celular: La expresión de la **ciclina D1** muestra una alta reactividad en nevus displásicos y en melanomas en fase de crecimiento radial (68% y 50% respectivamente), frente a la escasa expresión en nevus intradérmicos/compuestos (5%; $p<0.05$); y frente a los melanomas en fase de crecimiento vertical (16%; $p<0.05$). La expresión de las proteínas **p53** y **Rb** muestra un incremento progresivo de su expresión, si seguimos el modelo de progresión de del melanoma descrito por Clark (121). La proteína p53 se expresa en un 17% en nevus comunes, en un 30% en nevus displásicos, y en el 82% y 79% de los melanomas en fase de crecimiento radial y vertical respectivamente ($pI/V<0.05$ y $pD/V<0.05$). La proteína Rb se expresa en el 5% de los nevus comunes, en el 20% de los nevus displásicos, y en el 75% y 74% en melanomas en fase de crecimiento radial y vertical respectivamente. La proteína p21, que como ya se ha comentado anteriormente muestra una diferencia significativa en su expresión entre nevus displásicos (39%) y nevus comunes (5%), no muestra una diferencia significativa entre el nevus displásico y melanomas en fase de crecimiento radial (21%), o vertical (27%). En relación con la proteína p16, no se observan diferencias significativas, aunque existe una ligera tendencia hacia la disminución de su expresión desde los nevus intradérmicos/compuestos (98%), y displásicos (100%), hasta los melanomas en fase de crecimiento radial (94%) y vertical (89%).

* En relación con la **survivina**, se observa un importante incremento de su expresión en melanomas en fase de crecimiento radial (29%) y vertical (69%) frente a nevus adquiridos comunes y displásicos (0% en ambos; $pI/V=0.000$) (**Figura IV.15**).

* En cuanto al índice de proliferación **Ki-67**, muestra diferencias significativas entre nevus comunes (0%), displásicos (0%) y melanomas radiales (6%; $pI/R=0.288$), frente a melanomas en fase de crecimiento vertical (37%; $pI/V=0.000$).

	N. intrad-comp		N. displásico				Mel. radial						Mel. vertical							
	c/to	%(+)I	c/to	%(+)D	p (I/D)	p (I/D)*	c/to	%(+)R	p (I/R)	p (I/R)*	p (D/R)	p (D/R)*	c/to	%(+)V	p (I/V)	p (I/V)*	p (D/V)	p (D/V)*	p (R/V)	p (R/V)*
Proteínas específicas																				
HMB 45	0/42	0%	23/25	92%	0.000	0.000	15/15	100%	0.000	0.000	0.519	0.925	59/62	95%	0.000	0.000	0.623	1.000	1.000	1.000
Melan A	42/42	100%	25/25	100%	1.000	1.000	14/15	93%	0.263	0.569	0.375	0.747	57/62	92%	0.080	0.197	0.316	0.647	1.000	1.000
S-100	42/42	100%	24/24	100%	1.000	1.000	17/17	100%	1.000	1.000	1.000	1.000	62/62	100%	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Ciclo celular																				
Ciclina D1	2/42	5%	17/25	68%	0.000	0.000	8/16	50%	0.000	0.000	0.330	0.663	10/61	16%	0.116	0.272	0.000	0.000	0.008	0.024
CDK4	0/43	0%
p16	42/43	98%	26/26	100%	1.000	1.000	15/16	94%	0.472	0.872	0.381	0.744	55/62	89%	0.137	0.318	0.099	0.237	1.000	1.000
p21	2/43	5%	9/23	39%	0.001	0.004	4/16	25%	0.041	0.110	0.495	0.888	17/62	27%	0.004	0.012	0.304	0.630	1.000	1.000
p53	7/42	17%	7/23	30%	0.221	0.486	14/17	82%	0.000	0.000	0.002	0.007	49/62	79%	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000
Rb	2/43	5%	5/25	20%	0.091	0.221	12/16	75%	0.000	0.000	0.001	0.004	46/62	74%	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000
Apoptosis																				
Survivina	0/43	0%	0/24	0%	1.000	1.000	5/17	29%	0.001	0.004	0.008	0.024	42/62	68%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.015
Estabilidad ADN																				
MLH-1	42/42	100%	23/23	100%	1.000	1.000	10/14	71%	0.003	0.010	0.015	0.042	61/62	98%	1.000	1.000	1.000	1.000	0.003	0.010
MSH-2	39/42	93%	24/24	100%	0.295	0.617	17/17	100%	0.550	0.960	1.000	1.000	61/61	100%	0.065	0.163	1.000	1.000	1.000	1.000
Proliferación																				
Ki 67	0/42	0%	0/25	0%	1.000	1.000	1/17	6%	0.288	0.612	0.405	0.759	23/62	37%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.044
Receptores de membrana																				
Caveolina	42/42	100%	17/23	74%	0.001	0.004	3/16	19%	0.000	0.000	0.001	0.004	19/62	31%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.535	0.535
c-kit	1/40	3%	18/23	78%	0.000	0.000	14/16	88%	0.000	0.000	0.678	1.000	17/62	27%	0.001	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000
Transición epitelio-mesénquima																				
Cadh. E	13/42	31%	23/23	100%	0.000	0.000	15/17	88%	0.000	0.000	0.174	0.393	38/62	61%	0.003	0.010	0.000	0.000	0.044	0.116
Cadh. N	0/42	0%	0/23	0%	1.000	1.000	13/47	28%	0.000	0.000	0.003	0.010	.	.
SPARC	0/42	0%	21/23	91%	0.000	0.000	23/53	43%	0.000	0.000	0.000	0.000	.	.
Osteopon.	6/42	14%	3/24	13%	1.000	1.000	34/48	71%	0.000	0.000	0.000	0.000	.	.
PKCα	43/43	100%	10/24	42%	0.000	0.000	26/54	48%	0.000	0.000	0.631	1.000	.	.
WT1	29/42	69%	7/24	29%	0.002	0.007	3/17	18%	0.000	0.000	0.480	0.874	29/62	47%	0.028	0.076	0.153	0.352	0.049	0.126
Otras																				
HLA	1/41	2%	0/25	0%	1.000	1.000	0/14	0%	1.000	1.000	1.000	1.000	5/62	8%	0.398	0.751	0.316	0.647	0.577	0.986
Topoisom.	1/42	2%	4/23	17%	0.049	0.126	3/17	76%	0.000	0.000	0.000	0.000	49/62	79%	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000

Tabla IV.11. Características inmunohistoquímicas de melanomas en fase de crecimiento radial y vertical, y comparación con los nevus adquiridos y displásicos. Los datos reflejan el número de casos positivos del total (c/to), el porcentaje correspondiente (%), y el valor de la significancia (valor p y p corregida). Los resultados que han resultado significativos están marcados en rojo. Nevus I, intradérmicos; D, displásicos; Melanomas R, radiales; V, verticales.

* En relación con la expresión de proteínas implicadas en la reparación del ADN, MLH-1 y MSH-2: se observa una menor positividad de MLH-1 en melanomas en fase de crecimiento radial (71%), frente a nevus intradérmicos (100%; $p/R<0.05$) y nevus displásicos (96%; $pD/R<0.05$), y melanomas en fase de crecimiento vertical (98%; $pR/V<0.05$). MSH-2 no muestra diferencias significativas, observándose alta positividad en todos los casos (93-100%).

* La **caveolina**, receptor de membrana, muestra intensa positividad en nevus intradérmicos/compuestos (100%), que disminuye en nevus displásicos (74%; $pI/D=0.001$) y más aún en melanomas en fase de crecimiento radial (19%; $pDIR<0.05$) y vertical (31%; $pD/V<0.05$). Por otra parte, el receptor tirosín-quinasa **c-Kit** muestra una importante diferencia de expresión entre nevus comunes (3%) y nevus displásicos (78%; $pI/D<0.05$) y melanomas radiales (88%; $pI/R<0.05$); y entre melanomas radiales y verticales (27%; $p<0.05$).

* TEM: Se observa positividad para cadherina E en el compartimiento intraepidérmico, lo que explica una positividad del 88% en melanomas radiales que disminuye hasta el 61% en melanomas verticales (no significativo). Por otro lado, se ha comprobado que la cadherina N, osteopontina y SPARC/ osteonectina están significativamente asociadas al desarrollo de metástasis (214), favoreciendo propiedades específicas de adhesión, invasión y migración. Nuestro estudio muestra una positividad del 28% para **cadherina N** en melanomas verticales frente al 0% en nevus comunes y nevus displásicos ($pI/V<0.05$); positividad del 43% para **SPARC** en melanomas, frente al 0% en nevus intradérmicos-compuestos ($pI/V<0.05$), y el 91% en nevus displásicos ($pD/V<0.05$); positividad del 71% para **osteopontina**, frente al 14% y 13% en nevus comunes y nevus displásicos respectivamente ($p<0.05$ en ambos); y positividad del 48% para **PKC α** en melanomas frente al 100% en nevus adquiridos comunes ($pI/V<0.05$) y 42% en nevus displásicos, que no muestran una diferencia significativa (**Figura IV.15**).

* Otras proteínas estudiadas como la topoisomerasa, muestran una alta positividad en melanomas en fase de crecimiento radial y vertical (76% y 79% respectivamente) frente a nevus intradérmicos (2%; $pI/V<0.05$) y nevus displásicos (17%) (**Figura IV.15**). La expresión de HLA no muestra diferencias significativas entre grupos.

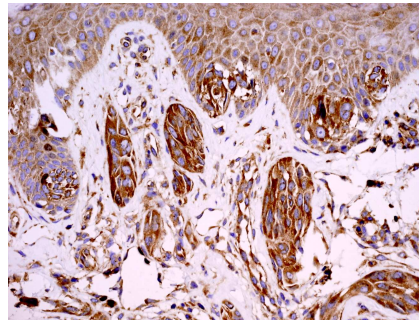
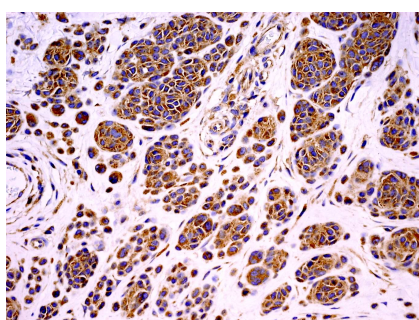
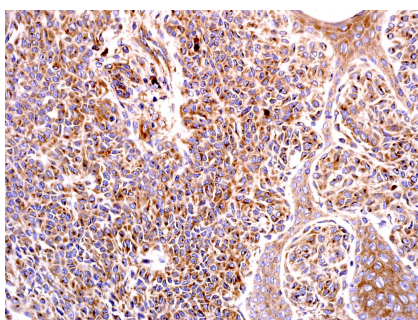
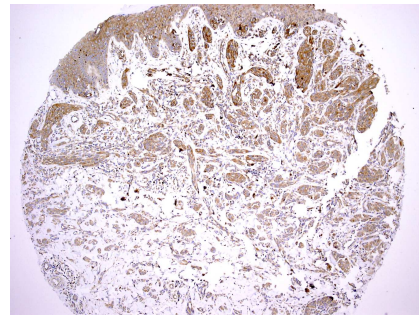
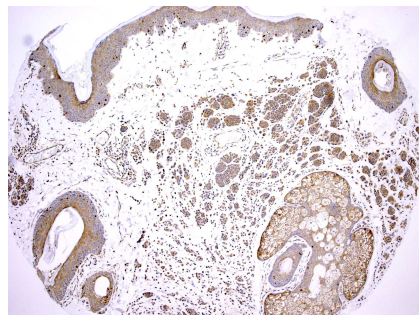
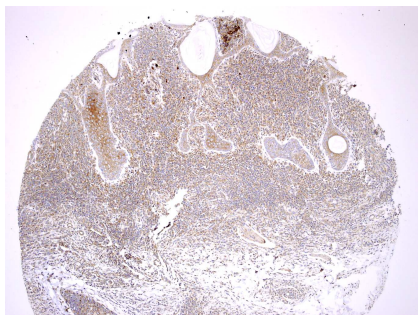
En resumen, se observan importantes diferencias en la expresión de marcadores proteicos entre melanomas primarios y nevus, aunque ninguno resulta definitivo para en diagnóstico diferencial. Así, se observa discretas diferencias en relación con las proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y un importante aumento en los niveles de survivina, proteína implicada en la inhibición de la apoptosis, sobre todo en melanomas verticales (68%) frente a nevus tanto adquiridos (0%) como displásicos (0%) y frente a melanomas en fase de crecimiento radial (29%). Se observa también un importante aumento de expresión en el índice mitótico (ki-67) en el melanoma en fase de crecimiento vertical (37%) frente a nevus benignos (0%) y frente al melanoma en fase de crecimiento radial (6%); y también un llamativo incremento de los niveles de expresión de la topoisomerasa en melanomas frente a nevus. Así mismo se observan diferencias significativas en la expresión de marcadores implicados en la transición epitelio-mesénquima, que traducen la expresión de proteínas que facilitan la invasión de la dermis.

Nevus congénito

Nevus intradérmico

Nevus de Spitz

Survivina



Topoisomerasa II α

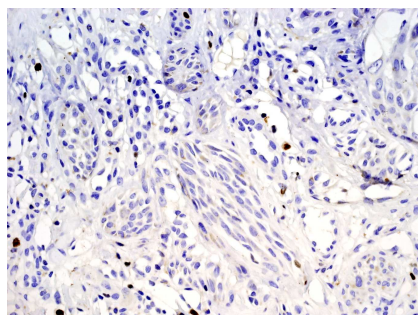
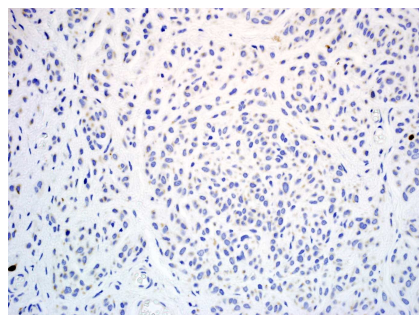
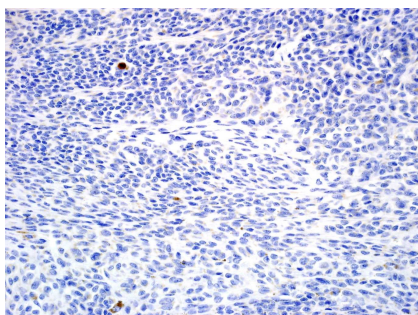
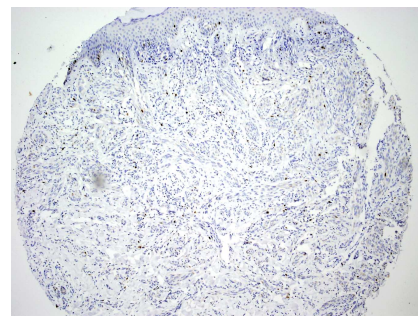
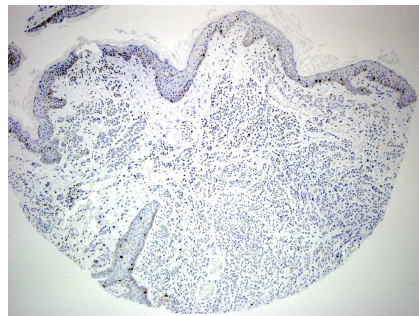
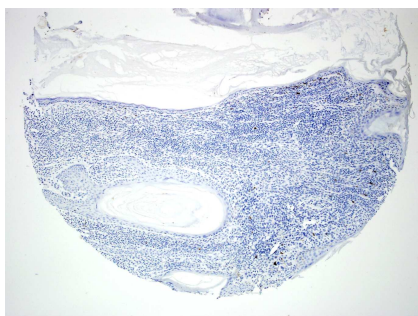
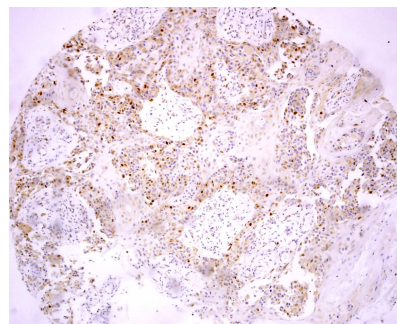
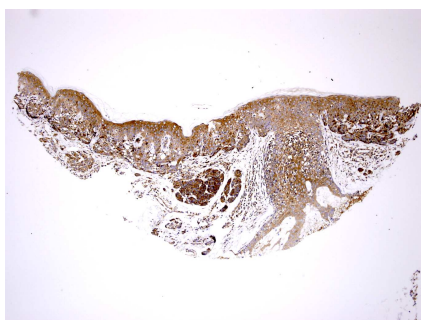


Fig IV. 15. Expresión de varios marcadores inmunohistoquímicos en varios cilindros correspondientes a lesiones melanocíticas benignas y malignas. Los cilindros corresponden a nevus congénitos (columna 1º), adquiridos comunes (columna 2º), de Spitz (columna 3º), displásicos (columna 4º) y melanomas en fase de crecimiento vertical (columna 5º). (Imágenes x100 y x400).

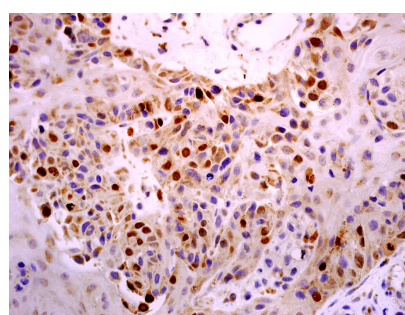
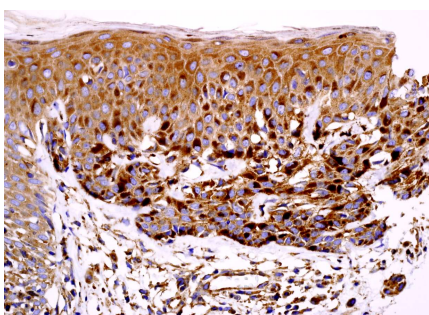
Nevus displásico

Melanoma crecimiento vertical

Survivina

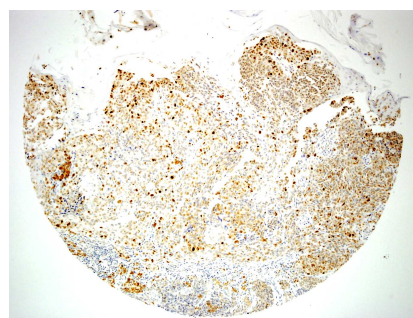
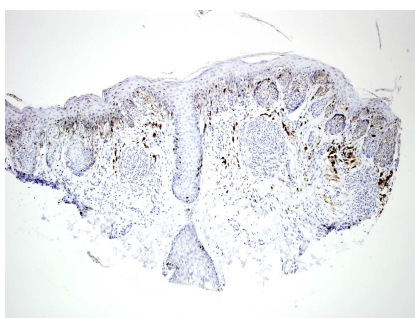


x 100

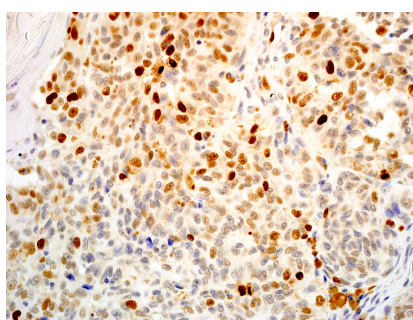
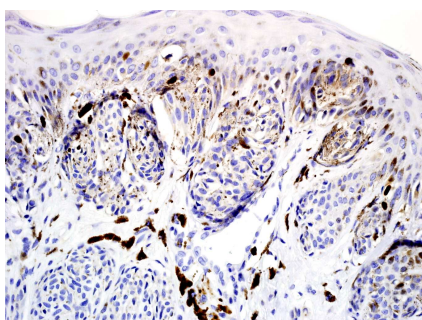


x 400

Topoisomerasa II α



x 100



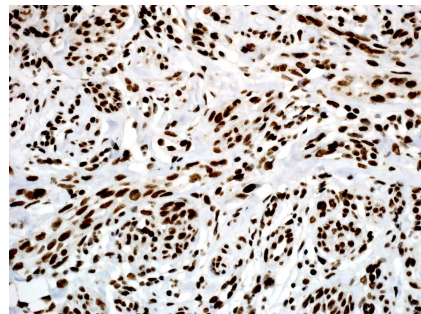
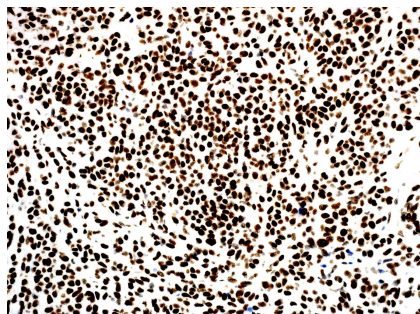
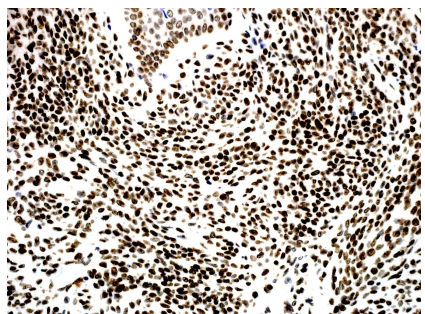
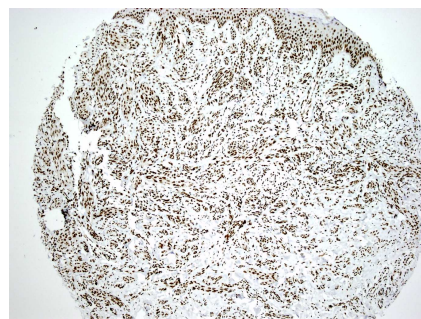
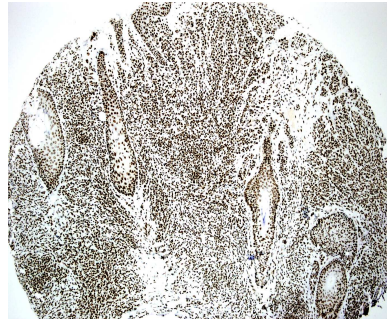
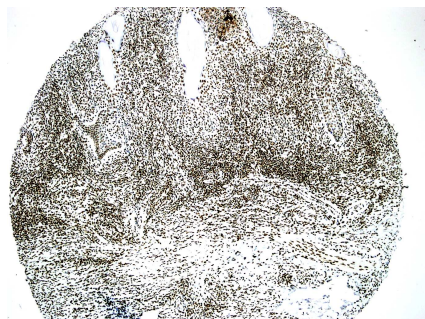
x 400

Nevus congénito

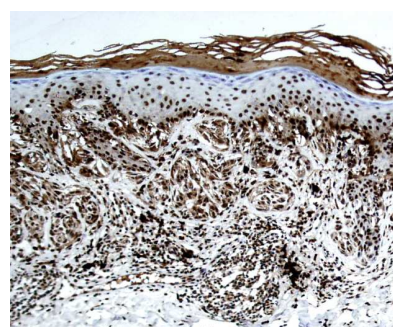
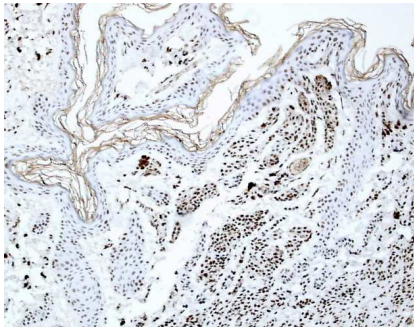
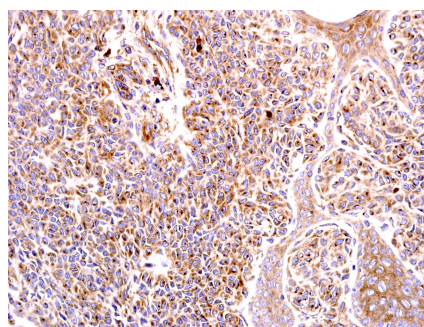
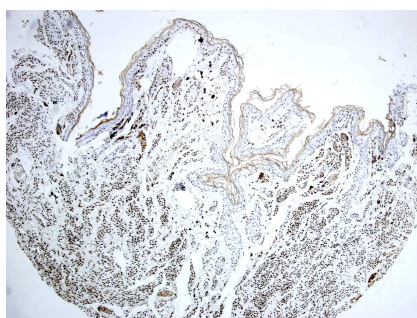
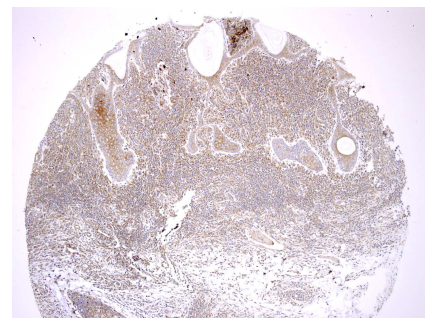
Nevus intradérmico

Nevus de Spitz

MHL-1



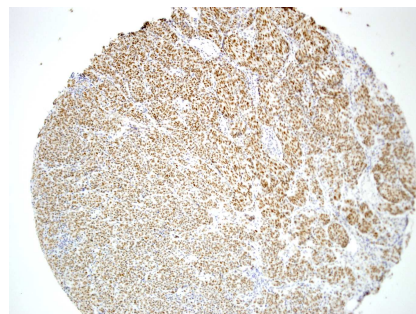
p16



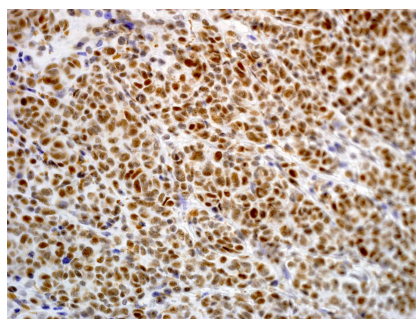
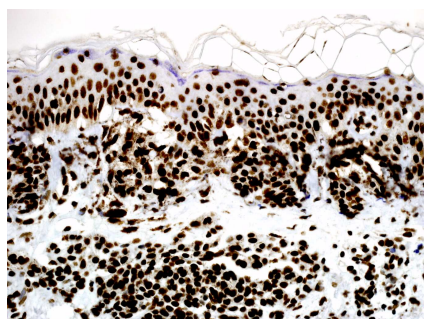
Nevus displásico

Melanoma crecimiento vertical

MLH-1

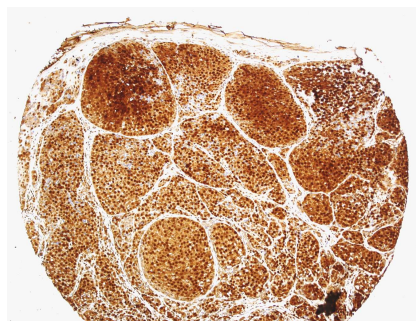
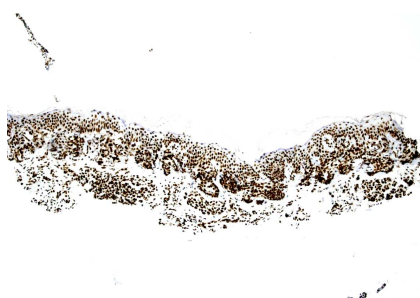


x 100

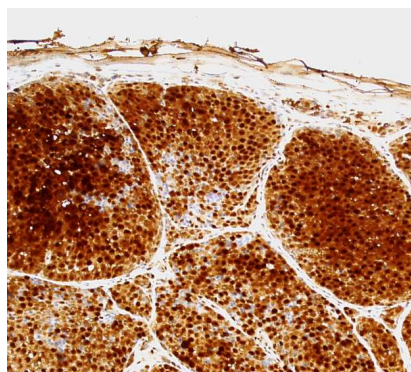
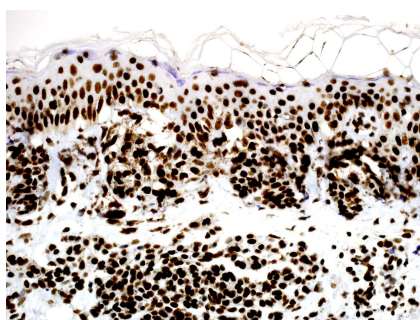


x 400

p16



x 100



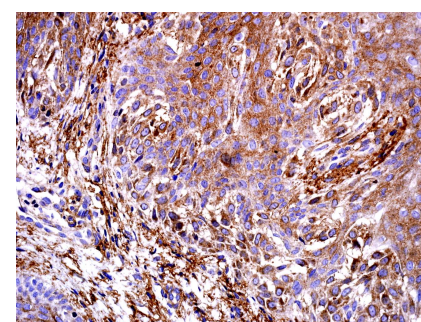
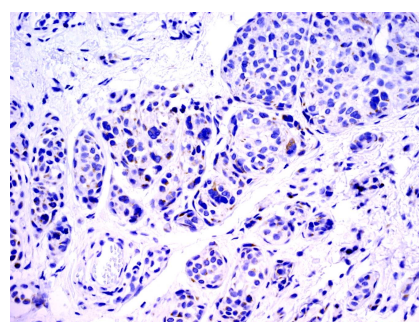
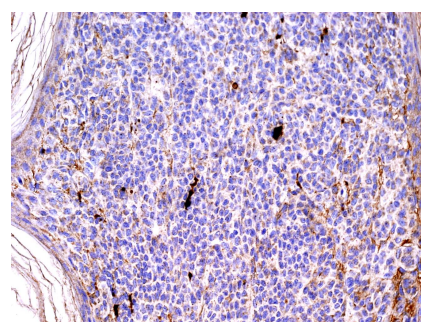
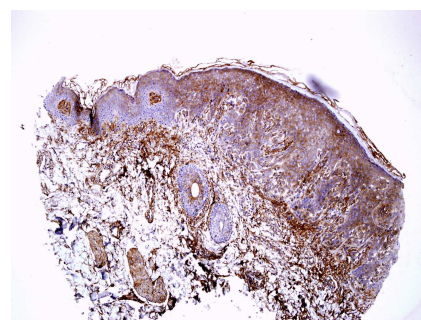
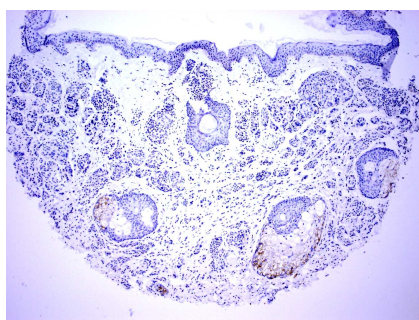
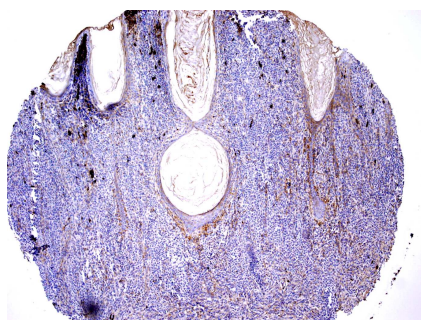
x 400

Nevus congénito

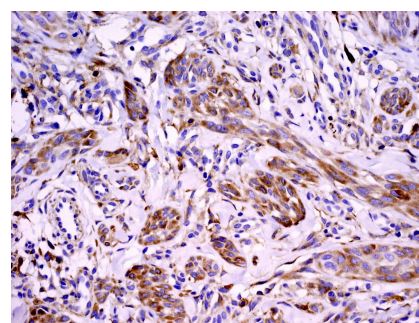
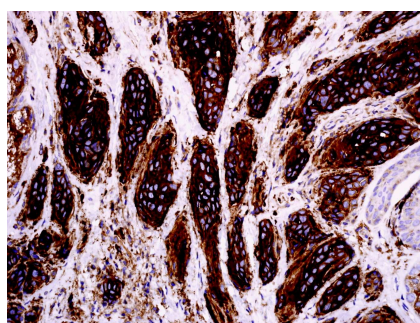
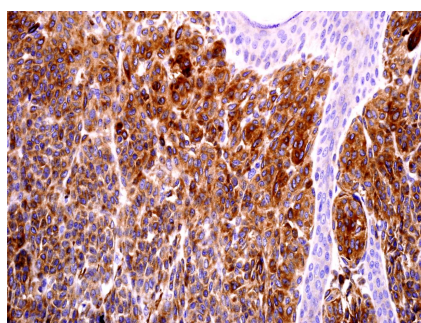
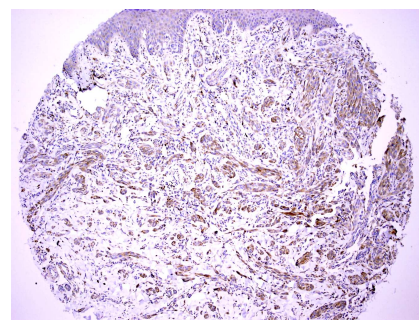
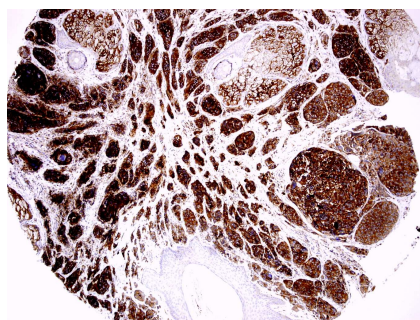
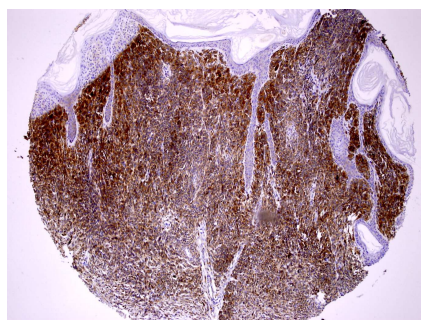
Nevus intradérmico

Nevus de Spitz

Osteopontina



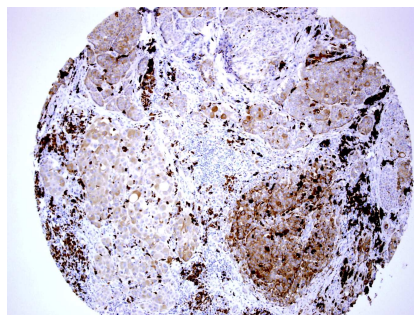
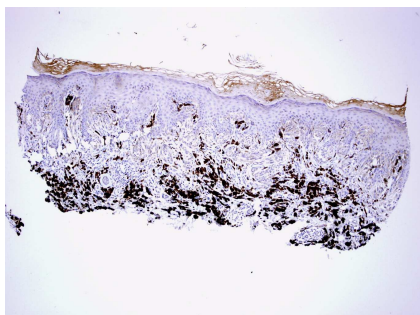
PKCα



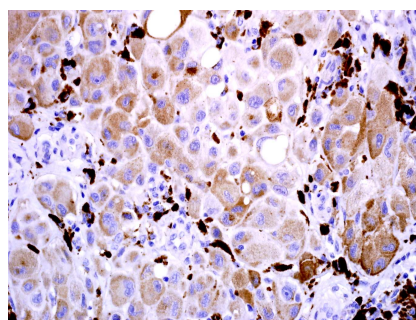
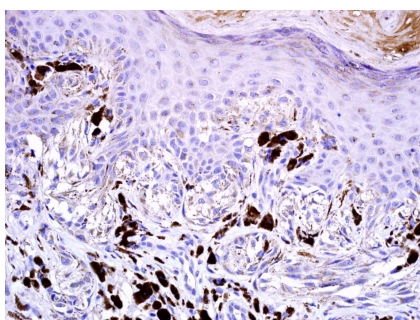
Nevus displásico

Melanoma crecimiento vertical

Osteopontina

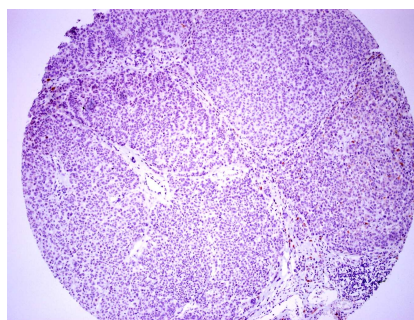
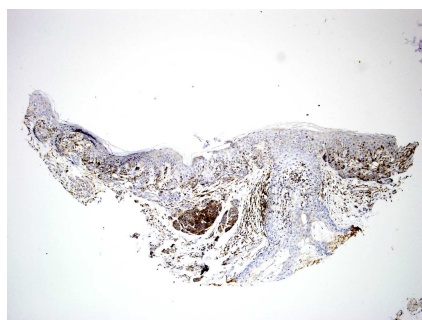


x 100

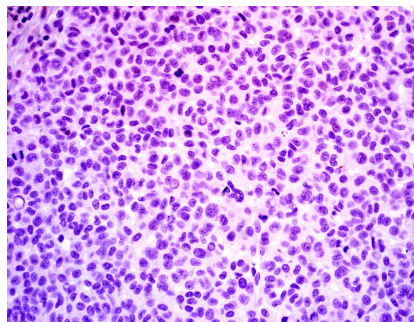
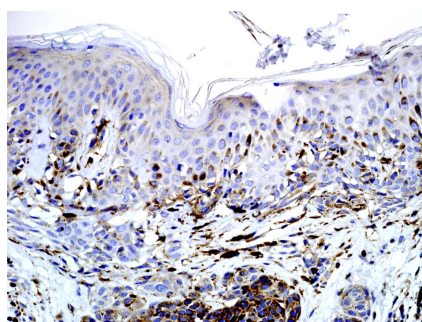


x 400

PKC α



x 100



x 400

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

En esta sección se comentará la relevancia del análisis de la expresión de los marcadores seleccionados en este estudio en este orden: 1/ marcadores de diferenciación melanocítica, 2/ receptores de membrana, 3/ proteínas de control del ciclo celular, 4/ proteína inhibidora de la apoptosis: survivina, 5/ marcador de proliferación: Ki-67, 6/ proteínas del sistema reparación del ADN, 7/ proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima, y 8/ otras.

1. Marcadores de diferenciación melanocítica

El diagnóstico de los tumores malignos pobremente diferenciados se facilita considerablemente con la aplicación de anticuerpos monoclonales. Aunque ninguno de estos anticuerpos ha demostrado especificidad absoluta para un determinado tipo de tumor, en la práctica clínica existen paneles de marcadores inmunohistoquímicos que obvian este problema. El diagnóstico histopatológico de los melanomas no requiere técnicas inmunohistoquímicas pero en casos de variantes “raras” o metástasis, la confirmación inmunohistoquímica resulta necesaria para alcanzar el diagnóstico definitivo. Los marcadores inmunohistoquímicos más ampliamente utilizados en la clínica diaria para apoyar el diagnóstico de melanoma son la proteína S-100, HMB-45 (gp-100) y Melan-A (MART-1).

Por su origen, los melanocitos expresan la proteína S-100, que es el marcador más sensible, aunque menos específico, tanto para nevus como para melanomas (362,272,273), como se observa también en nuestro estudio, que demostró 100% de inmunopositividad en todos los tipos de lesiones melanocíticas. La proteína S-100 es una proteína ácida, de 21 kD, de función no conocida, originalmente descrita en cerebro bovino, constituida por dos subunidades altamente homólogas (alfa y beta, homo o heterodímero) (363). La mayoría de los sueros reconocen determinantes antigénicos comunes de ambas subunidades (364). Estudios realizados con anticuerpos policlonales y monoclonales han demostrado reacciones similares, con marcada inmunoreactividad en las lesiones melanocíticas, así como en una gran variedad de tumores, del sistema nervioso periférico (schwanomas, neurofibromas, tumores de células granulares, sarcomas neurogénicos), el 50% de los carcinoides, condrosarcomas, cordomas, adenomas pleomorfos de glándula salival, pudiendo encontrarse en el citoplasma de estas células y también en el núcleo (365).

Melan-A (MART-1) está presente en la mayoría de los melanocitos dérmicos e intraepidérmicos de una gran variedad de nevus y de melanomas primarios. El gen de *Melan-A* (*MART-1: "melanoma antigen recognized by T cells"*) codifica una glico-proteína asociada a

melanosomas y al retículo endoplásmico, de 20-22 kD, de función incierta (366), reconocida por los linfocitos T citotóxicos autólogos (367), cuyo ARNm se expresa casi exclusivamente en melanocitos y tumores melanocíticos (366,367). En nuestro estudio se demuestra positividad en la mayoría de los nevus (96-100%), lo que coincide con estudios previos que han demostrado que melanocitos de nevus comunes y congénitos, de nevus azules y de nevus de Spitz son positivos para dicho marcador, con ligera disminución de su expresión en melanocitos con diferenciación schwanniana (nevus neurotizados) (368). En nuestros melanomas primarios observamos expresión de Melan-A en el 93%. Estos datos son similares a los observados en la literatura (positividad del 80-100%) (368,369). En melanomas metastásicos la positividad suele ser menor que en los primarios (368) y, en melanomas desmoplásicos, la tinción es frecuentemente negativa (370). Sin embargo, también se ha demostrado Melan-A en otros tumores de origen o diferenciación melanocítica, como el sarcoma de células claras, el neurofibroma melanocítico, el schwanoma melanocítico, y otros tumores melanocíticos derivados de la cresta neural; también en los PEComas (*“perivascular epithelioid cell tumor”*) y en angiolipomas (369). Aún así, Melan-A se considera uno de los marcadores “específicos” más útiles, que en general se incluye de rutina en los paneles estándar para melanomas.

Finalmente, el anticuerpo monoclonal anti-melanosoma *HMB-45* (*“Human Melanoma, Black”*) reacciona con una cadena lateral de oligosacáridos de un gluco-conjugado sialilado (*“MSA: melanosoma antigen”*), de 10 kDa, presente en melanosomas inmaduros (371). Este anticuerpo nos permite la identificación de melanocitos con formación activa de melanosomas en piel normal, nevus y melanomas (372), y se expresa en melanocitos fetales normales (371), pero no en fases de reposo de melanocitos adultos. Con su activación, los melanocitos adultos pueden volver a expresar el antígeno definido por HMB-45. *MSA* se ha observado en tumores melanocíticos en proporciones variables.

En nuestro estudio hemos demostrado un 0% de inmunopositividad en nevus intradérmicos y en nevus congénitos, mientras que se observa positividad para HMB-45 en nevus de Spitz (44%), y en la mayoría de los nevus displásicos (92%), lo que coincide con datos previamente observados por otros investigadores (372,373). Así, estos estudios (372) demuestran que en nevus de la unión y en nevus compuestos, los melanocitos intraepidérmicos expresan HMB-45 de forma intensa, mientras que la proliferación dérmica, a medida que madura, pierde inmunoreactividad, y el punto de corte establecido para definir la positividad del tumor es del 50% de células inmunoreactivas (372). Nuestra serie de melanomas demuestra también positividad para HMB-45 en la mayoría de los melanomas primarios tanto en fase de crecimiento radial como vertical (100% y 95% respectivamente), como en otras series previas (60-95%) (372). Este estudio demostró también que los melanomas fusocelulares o desmoplásicos son negativos en su mayoría o sólo focalmente positivos (372).

La demostración inmunohistoquímica de HMB-45, es útil en la identificación de

diferenciación melanocítica, especialmente en tumores indiferenciados, y en disecciones ganglionares para detectar metástasis de melanoma. Sin embargo, S-100 es más sensible que HMB-45, y Melan-A se expresa en más nevus y más melanocitos por nevus que HMB-45 (368).

2. Receptores de membrana

2.1. Caveolina

Las caveolas, identificadas originalmente como invaginaciones de la membrana plasmática (con un tamaño de 50-100 nm) en células endoteliales y epiteliales (374), son especializaciones de los “rafts” (dominios enriquecidos en glicosfingolípidos y colesterol, insolubles en detergentes no iónicos) que contienen la proteína caveolina. Las caveolinas son una familia de proteínas integrales de membrana de 21-25 kDa (que se expresan ubicuamente, sobre todo en adipocitos, células endoteliales, fibroblastos y células musculares lisas) (375), que forman homo-oligómeros que pueden interaccionar unos con otros dentro de los rafts para formar las invaginaciones de los dominios de membrana que podemos ver como caveolas.

Las caveolas han sido implicadas en numerosas funciones como la internalización de determinadas pequeñas moléculas (376) y como proteína de andamiaje que organiza y concentra determinados lípidos (colesterol y glicosfingolípidos) y están implicadas en varias vías de señalización (377). El proceso de transformación oncogénica, se asocia a una disminución de los niveles de caveolina (378).

Son muy escasos los trabajos que estudian la expresión de caveolina en lesiones melanocíticas. Aunque existen estudios aislados realizados sobre líneas celulares de melanomas humanos (379,380) que demuestran que la sobreexpresión de caveolina-1 conlleva una disminución del crecimiento y de la motilidad celular, no existen trabajos sobre su expresión en lesiones melanocíticas benignas humanas. Únicamente existen referencias aisladas en algún estudio (265), en el que se observa una disminución significativa de la expresión entre nevus y melanomas en fase de crecimiento radial. Nuestros resultados demuestran una mayor expresión en nevus melanocíticos intradérmicos/compuestos (100%) y congénitos (100%) que en nevus displásicos (74%; $p/D=0.001$) y una discreta positividad en melanomas radiales (19%) y verticales (31%) con una diferencia significativa frente a los nevus ($p=0.000$). Aunque esta disminución parece asociarse a un mayor crecimiento celular y estímulo de la neovascularización según estudios previos realizados en líneas celulares (379,380), nuevos estudios son necesarios para establecer el papel de la pérdida en la expresión de la caveolina precozmente en la progresión de los tumores melanocíticos y esclarecer los mecanismos de actuación. También cabe destacar la disminución en la expresión de caveolina

en los nevus de Spitz (62%; $p/S<0.05$) frente a nevus comunes, con una diferencia significativa, que podría contribuir a un aumento de la motilidad celular (379).

Por el momento no se han aclarado los mecanismos que conllevan a la reducción de los niveles de caveolina: podría ser el resultado directo de un estímulo oncogénico o la transformación oncogénica selectiva predominante en células que expresan niveles bajos de caveolina (378). Se han descrito tres mecanismos capaces de alterar o reducir los niveles de caveolina en las células transformadas: 1/ en algunas células, la fosforilación de la caveolina en su residuo de tirosina; 2/ en ocasiones, se ha observado la disminución de los niveles habitualmente estables de ARNm de caveolina; 3/ y por último, la disminución de los niveles de proteína con respecto a las células normales, sin una reducción paralela de sus niveles de ARNm, parece implicar otro mecanismo regulador en la síntesis o estabilidad de la caveolina (378). Este mismo estudio (378), sugiere que existe una relación entre los niveles de caveolina y el crecimiento celular en agar (en líneas celulares), aunque sin relación con sus niveles séricos. Además, existen estudios que relacionan la disminución en los niveles de caveolina con la pérdida del estímulo apoptótico inducido por la caspasa-3 (381) y también con un importante papel en la neovascularización y por tanto en el desarrollo de la enfermedad metastásica (382,383).

Estos efectos se explican porque la caveolina presenta un dominio de andamiaje ("caveolin scaffolding domain") (CSD) por el que interacciona directamente con las proteínas señalizadoras, como las quinasas de la familia Src (384), la óxido nítrico-sintasa (NOS) (385), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (386) o las subunidades $G\alpha$ de las proteínas G hetero-triméricas (387), y las mantiene en una conformación inactiva (387). Así, la unión de un ligando, como el factor de crecimiento (GF), a su receptor (EGFR) que induce la dimerización y fosforilación de este último, desencadenando la cascada de señalización de las MAP quinasas y que promueve, en última instancia, la proliferación celular, es inhibida por la caveolina al unirse por su dominio CSD al dominio de interacción con caveolina del receptor que, en general, está localizado dentro de su dominio catalítico activo. Otras proteínas de esta ruta señalizadora, como ERK, Grb-2, RAS o RAF se han encontrado localizadas en los rafts (375), e incluso algunas de ellas interaccionan directamente con caveolina, como es el caso de ERK (388). Teniendo en cuenta que muchas de estas moléculas señalizadoras pueden causar transformación celular cuando se activan constitutivamente, es razonable pensar que la caveolina puede poseer por sí misma actividad como proteína supresora tumoral. La caveolina está implicada por estos mecanismos en la inhibición de la transducción de señales, y en la inhibición de la angiogénesis (382,387). Esta proteína también se relaciona con los receptores de la familia de las integrinas, moléculas críticas en la integridad tisular y en la homeostasis, que conectan la actina del citoesqueleto con la matriz extracelular y desencadenan la vía de señalización intracelular (MAPK) (389,390).

En resumen, la pérdida de caveolina puede ser considerada un marcador de progresión tumoral con una disminución significativa en nevus displásicos frente a nevus comunes, y en melanomas primarios frente a nevus displásicos.

2.2. CD117/ c-kit

El gen c-kit, localizado en el cromosoma 4 (4q11-12), próximo al gen del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y al gen del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) codifica para una glicoproteína transmembrana de 145 KDa, que funciona como un receptor de membrana con actividad tirosín-quinasa. CD 117 es un epítipo localizado en el dominio extracelular del receptor. c-Kit es estructuralmente similar a otros receptores con actividad tirosín-quinasa con posibilidades oncológicas como el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFRs) A y B, CSF1R (factor estimulante de colonias) y otros (391). Se ha observado expresión de c-kit en células hematopoyéticas progenitoras, células cebadas, melanocitos, células germinales y células intersticiales de Cajal (392,393).

La activación del receptor se produce cuando el ligando dimérico SCF (*“stem cell factor”*) se une a dos receptores adyacentes, lo que produce una homodimerización de dos proteínas c-kit que producen una serie de cambios estructurales en el receptor y una activación del dominio intracitoplásmico tirosín-quinasa, lo que conlleva la autofosforilación de algunos residuos de tirosina y de otras proteínas (390,394). El resultado final es la activación de una serie de señales que actúan sobre procesos cruciales en la tumorigénesis como la proliferación celular, la adhesión, la apoptosis y la diferenciación. Este receptor juega un papel crucial en muchas actividades celulares en los melanocitos: migración, supervivencia, proliferación y diferenciación (395,396,397). Y, aunque las vías de señalización mediadas por c-kit han sido extensamente estudiadas en células hematopoyéticas, aún no se han aclarado completamente los mecanismos por los que este receptor regula los diferentes aspectos de la fisiología en el melanocito.

Estudios previos sobre lesiones melanocíticas (398-400) demuestran una importante positividad para c-kit en nevus intradérmicos/compuestos (59% (400)-70% (399)), con la células inmunoreactivas predominantemente localizadas en el compartimiento intraepidérmico o dérmico superficial, y está prácticamente ausentes en la dermis profunda. La expresión local de SCF por los queratinocitos podría explicar la expresión de c-kit en los melanocitos en la epidermis permitiendo así la respuesta al factor de supervivencia SCF (399). En nuestro estudio la mayoría de los nevus seleccionados, nevus congénitos e intradérmicos/compuestos muestran un importante componente dérmico, por lo que se ha observado escasa o nula positividad para c-kit (0-3%). En nevus de Spitz, se observa discreta positividad (12%), especialmente en el componente intraepidérmico, que se va perdiendo con la progresión del componente dérmico, lo que coincide con otros estudios (401). Existe un incremento importante

en la expresión de c-kit en los nevus displásicos frente a los nevus comunes (78%; $pI/D < 0.05$), con una tinción fuerte, especialmente en el componente juntural, lo que también coincide con otros estudios de la literatura (398-400). En melanomas, la expresión de c-kit ha sido objeto de controversia. Aunque muchos estudios previos sostenían que la expresión de c-kit se perdía con la progresión del melanoma o que afectaba negativamente al crecimiento tumoral (402-406), estudios más recientes demuestran una positividad de más del 50% en melanomas primarios (10 de 18 casos, 56% (398)-22 de 23 casos, 96%(400)) y en algunas series de melanomas metastásicos (17 de 31 casos, 55% (400)), esta diferencia se puede deber a que la mayoría de los estudios más antiguos se han realizado sobre líneas celulares (402-404), a que no se subdividen los tipos de melanomas o a la mayor sensibilidad de los nuevos anticuerpos. Nosotros observamos expresión de c-kit hasta en el 40% de los casos de melanomas primarios (31 de 78 casos) lo que coincide con los estudios más recientes (398-400), con una alta inmunopositividad en melanomas en fase de crecimiento radial (hasta el 88%), que disminuye considerablemente en melanomas en fase de crecimiento vertical (27%; $pR/V < 0.05$), lo que demuestra la pérdida progresiva de su expresión en el componente dérmico.

En el estudio de *Curtin et al.* (407), se demuestra que en melanomas acrales, de mucosas y aquellos que se dan en piel crónicamente dañada por el sol, en los que las mutaciones en B-RAF y N-RAS son muy infrecuentes, existen frecuentes alteraciones génicas que afectan a c-kit. En este mismo estudio (407) los autores demostraron niveles altos de proteína c-kit en melanomas primarios con mutaciones (79%) y con múltiples copias de KIT (53%); posteriormente, aumentando las concentraciones de anticuerpo, el resto de los melanomas (que inicialmente no mostraron inmunoreactividad frente a c-kit) que presentaban mutaciones o incremento del número de copias, mostraron positividad para c-kit. Incluso el 31% de los melanomas que no mostraron mutaciones o incremento del número de copias también mostraron un aumento en la expresión de c-kit, lo que demuestra que la alteración de KIT en el melanoma puede deberse a una mutación (se han descrito varias), a una amplificación génica, o a una aberración génica que no haya sido detectada por el momento. Una de las mutaciones frecuentemente observada en el melanoma es K642E (4q12), mutación oncogénica que se observa frecuentemente en pacientes con tumores GISTs esporádicos y familiares que son altamente sensibles al imatinib (408). La discordancia entre los estudios previos y este último (407) puede ser debido a que estos estudios se llevaron a cabo sobre líneas celulares, que frecuentemente derivan del subtipo de melanoma que aparece sobre piel intermitentemente expuesta al sol y que presentan frecuentemente la mutación BRAF (407), lo que apoyaría la hipótesis de que c-kit no actúa como oncogen en este subtipo de melanomas.

La expresión de c-kit en tumores malignos resulta de interés porque es una de las dianas del inhibidor de la tirosín-quinasa, imatinib mesilate (Gleevec). El imatinib demostró su eficacia inicialmente en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (409), y en pacientes con tumores del estroma gastro-intestinal GIST c-kit-positivos (410). Posteriormente, se observó que la respuesta al imatinib es particularmente importante en tumores que poseen la mutación activadora de KIT (411). A raíz de estas observaciones, se han realizado estudios (412) para la

identificación de tumores que pudieran beneficiarse de dicha terapia. Para ello, se estudió la expresión de KIT en una gran variedad de tumores: se demostró leve-moderada ($\leq 30\%$) expresión de KIT en varios tipos de tumores, y sólo $>30\%$ en seminomas y melanomas (412). Sin embargo, los ensayos terapéuticos de esta droga en melanomas metastáticos no revelan respuestas objetivas por el momento (413).

En resumen, la proteína c-Kit es un marcador en fases iniciales de la progresión del melanoma con un incremento significativo en nevus displásicos y melanomas en fase de crecimiento radial frente a nevus comunes y con menor expresión en melanomas en fase de crecimiento vertical. Los casos de melanomas con niveles altos de proteína c-kit, suelen estar relacionados con mutaciones y con múltiples copias de KIT y puede tener implicaciones terapéuticas para el melanoma.

3. Proteínas de control del ciclo celular

El ciclo celular se divide en dos fases funcionales, S y M, y dos fases preparatorias, G_1 y G_2 (414,415). El material genético de la célula se duplica durante la fase S. Una vez duplicado el ADN de los cromosomas, estos se segregan de manera equitativa a cada uno de los núcleos de las células hijas durante la fase M o mitosis. Las fases preparatorias G_1 y G_2 se consideran puntos de control para asegurar que los procesos de síntesis de ADN y segregación cromosómica tienen lugar correctamente (414). Las células pueden dejar de dividirse y entrar en la fase G_0 o de quiescencia (415). Existen dos niveles en el control del ciclo celular: uno extrínseco y otro intrínseco. Las vías de regulación extrínsecas actúan en respuesta a las condiciones ambientales en las que se encuentra la célula (factores activadores e inhibidores de la progresión del ciclo celular), mientras que las vías intrínsecas son responsables de la progresión ordenada de los eventos del ciclo celular. La progresión secuencial a través de las diferentes fases del ciclo celular está determinada por la activación de cascadas de fosforilación/defosforilación que modulan la actividad de diferentes proteínas que se encuentran bajo “supervisión” de los diferentes puntos de control, distribuidos a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (414).

La maquinaria básica que coordina la progresión del ciclo celular está constituida por una familia de proteínas denominadas quinasas dependientes de ciclinas o CDKs ya que para ser activas necesitan de la asociación a un segundo tipo de proteína, las ciclinas, que se expresan a lo largo del ciclo celular de forma transitoria y en el momento preciso. El holoenzima completo está constituido por una subunidad catalítica, la quinasa, y la subunidad reguladora específica, la ciclina (414). Se han identificado diferentes complejos Ciclina/CDK que controlan la progresión ordenada del ciclo celular (**Figura V.1**) (416).

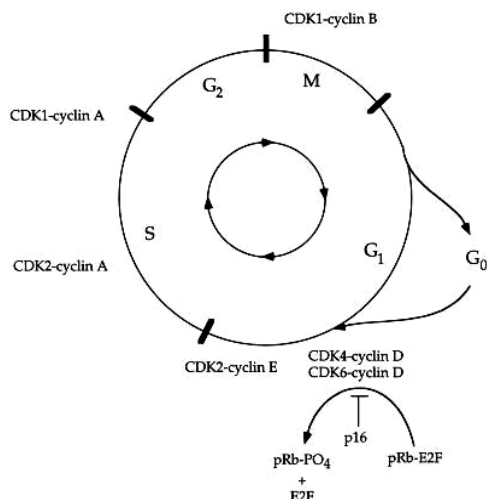


Fig V.1. Representación esquemática del ciclo celular y la actividad reguladora de múltiples complejos CDK-ciclina. Collins et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1997 (414).

La síntesis de diferentes ciclinas en cada momento del ciclo celular constituye un nivel de regulación de la actividad de las CDKs. Así, los genes de respuesta temprana, en respuesta a los factores de crecimiento presentes en el medio, como Sp1 y c-Myc, activan la expresión de la ciclina D (D1, D2 o D3) que forma complejo con la CDK4 y CDK6 durante las fases G₀ y G₁ (417,418). Durante la fase G₁, los complejos CDK4/6-ciclina D activan la transcripción de la ciclina E, que regula transición G₁/S formando un complejo con la CDK2 (415). Tras la síntesis de la ciclina E, se sintetiza la ciclina A que se une a la CDK2 durante la fase S, y a la CDC2 (CDK1) durante la fase G₂ (415). La entrada en la fase de división o fase M está regulada por las ciclinas de clase B, que también forman complejo con la CDC2 (415). El complejo ciclina B/CDC2 es el responsable de la inducción de la mitosis y también se conoce como factor MPF (*M phase promoting factor*) (415,416).

La familia proteica de inhibidores de CDKs o CKIs constituye un nivel adicional de regulación de la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas. Se han descrito dos clases: la familia de proteínas INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} y p19^{INK4D}), que se unen a las CDK4 y 6, interfiriendo la asociación de estas CDKs con sus ciclinas, y la familia CIP/KIP (p21^{WAF1}, p27, y p57), que forman complejos ternarios con los complejos ciclina E/CDK2 y ciclina A/CDK2, inhibiendo su actividad, mientras que en el caso del complejo ciclina D/CDK ejercen la función contraria (415,419).

Una vez que un complejo ciclina /CDK específico ha ejercido su control en un punto concreto de la progresión del ciclo celular, normalmente es necesaria su inactivación para que la célula pueda completar la fase con éxito. El proceso de inactivación definitivo de estos complejos está mediado por procesos de proteólisis dependientes de ubiquitina (419).

La activación secuencial de los diferentes complejos ciclina/CDK modula la actividad de la proteína del Retinoblastoma, que juega un papel central en la regulación del ciclo celular. La proteína pRB es una proteína nuclear que se une de manera específica a otras proteínas implicadas en el control de la expresión génica. La capacidad de unión de la proteína pRB a estas proteínas depende de su estado de fosforilación (415). La forma hipofosforilada de la proteína pRB se encuentra presente en las células durante la fase G₁ del ciclo celular unida al factor de transcripción E2F, manteniendo el estado inactivo de éste último, reprimiendo la actividad del complejo transcripcional y evitando la expresión de varios genes cuyos productos son necesarios para el desarrollo de la transición G₁/S y de la fase S (420). El complejo ciclina D/CDK4-6 activo fosforila diferentes residuos de la proteína pRB durante la fase G₁ haciendo que se pierda afinidad por el factor E2F, que queda libre. El factor E2F libre activa la transcripción de genes implicados en la transición de G₁ a S, como ciclina E, ciclina A y c-myc y de genes implicados en la síntesis y replicación del ADN, como el gen ADN-polimerasa A (415).

La progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular está regulada por los

puntos de control ("checkpoints"), que se encargan de asegurar el éxito de la división celular. El punto de restricción R, *start* S, o de control G1, evita la entrada de las células en fase S cuando las condiciones ambientales o el tamaño celular no son adecuados, o cuando la célula tiene el ADN dañado. El punto de control G2 controla que la replicación durante la fase S haya sido correcta y que las condiciones ambientales sean las apropiadas para que la célula pueda iniciar la mitosis. Durante la transición metafase-anafase existe un punto de control adicional, que asegura que los cromosomas estén correctamente alineados y que no haya errores en el huso acromático (421).

Cuando se detectan alteraciones en el ADN, se activan los puntos de control y se produce la parada de la progresión del ciclo celular en las fases G1 o G2, la activación de genes de reparación de ADN, la inducción de la senescencia celular o la muerte celular por apoptosis. Los genes supresores de tumores como p53 son claves en la respuesta celular frente al daño en el ADN (422). Cuando ocurre un daño en el ADN se pone marcha una vía de señalización que activa p53, frena la división celular y permite la acción de las enzimas reparadoras del ADN, previo a la replicación del mismo, activando inhibidores de quinasas, que bloquean la fosforilación de la proteína RB, deteniendo la progresión del ciclo celular en las fases G1 y G2. Si el daño no puede ser reparado, p53 participa en la inducción de la apoptosis previniendo, incluso permanentemente, la propagación de una célula que podría sufrir alteraciones genéticas estables y por lo tanto podría tener una susceptibilidad incrementada a la transformación maligna. La inducción de la apoptosis se lleva a cabo junto con proteínas codificadas por genes como BCL-2 (423).

3.1. Ciclina D1

Las ciclinas son proteínas activadoras de las serín/treonín quinasas, cuya concentración celular oscila en función de la fase del ciclo en la que se halle la célula y que controlan la progresión del ciclo. Tienen una alta similitud en cuanto a su composición en amino-ácidos, ya que tienen en común una región de 100 aminoácidos llamada "box de las ciclinas" que sirve para unir y activar a las quinasas dependientes de ciclinas. El gen de la ciclina D1 o CCND1, de 15 kD, está localizado en el locus 11q13 (424). La proteína es inducida rápidamente en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento y está estrechamente regulada tanto a nivel transcripcional, expresión proteica o localización celular y rápidamente sus niveles decrecen cuando desaparecen dichos estímulos (425).

La implicación de la ciclina D1 en la progresión del ciclo celular y en la transcripción de algunos genes permite comprender su papel oncogénico en algunos tumores (426). La translocación cromosómica de la ciclina D1, relativamente rara en la mayoría de los cánceres, ocurre en más del 90% de los linfomas del manto (427), y en menor frecuencia en el mieloma

múltiple y leucemias específicas (427). Sin embargo, la amplificación génica o la sobreexpresión de la ciclina D1 ocurren con mayor frecuencia en otros tipos de tumores, como el carcinoma de mama y el carcinoma esofágico (428,429). Además de estos mecanismos, se baraja la posibilidad de que mutaciones activadoras de la ciclina D1 puedan estar implicadas en el desarrollo de tumores, incrementando su asociación con CDK4 o alterando su capacidad para modular la transcripción génica (426). La expresión de la ciclina D1 también se ha correlacionado con el estadio, el grado, y el pronóstico de varios tumores (430).

Su papel en el desarrollo, progresión y pronóstico del melanoma es controvertido. Mientras que algunos estudios muestran que no existen diferencias significativas en la expresión de la ciclina D1 entre nevus y melanomas (430,431), otros muestran sobre-expresión de dicha proteína en los melanomas (431,432). En nuestro estudio observamos una mayor expresión en nevus displásicos (68%) y en melanomas en fase de crecimiento radial (50%) que en nevus congénitos (0%), nevus adquiridos comunes (5%), y en melanomas en fase de crecimiento vertical (16%), lo que sugiere que la ciclina D1 podría tener un papel en el desarrollo inicial de las lesiones melanocíticas malignas, siguiendo el esquema de Clark (121).

Nuestros resultados contrastan con los de algunos autores (430,431) que observan una débil positividad para ciclina D1 en melanomas primarios (15%; *punto de corte* >26% de células positivas (430); 9%; *punto de corte* >5% (431)). Estas diferencias pueden estar en relación con la selección de la serie de melanomas, o con la sensibilidad del anticuerpo utilizado. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con los observados en varias series de melanomas (432,433). Por otra parte, la escasa positividad observada en nevus comunes coincide con los resultados de otros trabajos (430-435) (0-8% de positividad). La alta positividad de ciclina D1 demostrada en nevus displásicos y en nevus de Spitz con un patrón zonal, diferente del patrón difuso observado en los melanomas, podría servir como herramienta para distinguirlos de los melanomas. Los nevus displásicos muestran una disminución de la expresión de ciclina D1 a medida que las células névicas maduran hacia la dermis, por lo que parece mantenerse bajo el control de otros mecanismos biológicos (434). Algunos autores han observado también una correlación significativa entre el grado de atipia citológica y la expresión de ciclina D1 (434-437), estos datos apoyarían a su vez la hipótesis de que el nevus displásico representa una lesión intermedia en la progresión de los tumores melanocíticos con una pérdida progresiva de los mecanismos de control (121,438). Sin embargo, el mecanismo subyacente de la sobreexpresión de ciclina D1 no ha sido aclarada por el momento: no es frecuente la amplificación, ni el incremento del número de copias en su locus en el cromosoma 11 (434).

La expresión de ciclina D1 en nevus de Spitz es alta (74%), como ya se ha observado en estudios previos (hasta 73% (435)), y también demuestra una tinción zonal, con mayor positividad en células de la dermis papilar que reticular (435). La alteración en la ciclina D1 parece no ser suficiente para una desregulación del crecimiento controlado de los melanocitos,

lo que sugiere la existencia de mecanismos adicionales implicados.

3.2. Quinasa dependiente de ciclina CDK4

Las quinasas dependientes de ciclinas constituyen un grupo de serina/treonina quinasas que forman complejos heterodiméricos activos al unirse a sus subunidades reguladoras, las ciclinas, y regulan la progresión de la división celular. El gen de CDK4 está localizado en 12q13, en la misma región que CDK2. Esta región cromosómica se localiza en un área cercana a un punto de ruptura de frecuente translocación en diversos tumores sólidos (lipomas, liposarcomas, leiomiomas, adenomas pleomórficos) y leucemias. Por otra parte, los genes MDM2 y GLI1, localizados también en esta región, resultan amplificados en varios tumores, convirtiéndose así en oncogenes (439).

La cascada CDK-ciclinaD/INK4/pRb/EF2 está alterada hasta en un 80% de las neoplasias humanas, bien por mutaciones en los genes que codifican estas proteínas, o bien en reguladores de la misma (440). Existen muy escasos estudios relacionados con la expresión de CDK4 en lesiones melanocíticas (430,441,442). Nuestro estudio demuestra que no existe expresión de CDK4 en nevus melanocíticos congénitos (0%), adquiridos (0%), ni en nevus de Spitz (0%). No se ha podido incluir el estudio de este marcador en melanomas, por la pérdida progresiva del material durante el mismo. No obstante, estudios previos (440) han demostrado que CDK4 está amplificado y sobreexpresado en una gran variedad de tumores y líneas celulares tumorales. Y, en muchos de ellos, gliomas, sarcomas, carcinomas de mama y carcinomas de cérvix uterino muestran además co-amplificación con el locus MDM2 como parte de un amplicón localizado en el cromosoma 12 (12q13-14). Además, se han descrito mutaciones puntuales en secuencias codificantes de CDK4 y CDK6 en tumores y líneas celulares tumorales que incluyen líneas celulares de melanoma y que producen una alteración de la actividad quinasa previniendo la unión de los inhibidores INK4, y sin afectar la afinidad de CDK4 y la ciclina D1. Presumiblemente, en estos tumores aunque no se observe un incremento de la actividad quinasa CDK4, existe un tiempo inapropiadamente más largo de actividad, debido a la ausencia de la regulación negativa proporcionada normalmente por dichos inhibidores (440).

En muestras de melanomas humanos, aunque existen raros casos de familias propensas a melanoma con mutaciones activadoras en CDK4 que la hacen insensible a la inhibición por p16^{INK4} (443), se han observado ganancias en el número de copias en el cromosoma 12q14 en 3.8% de los melanomas (22.7% de melanomas acrales) (441). Posteriormente se ha demostrado (442) que en melanomas con niveles altos de amplificaciones de 12q14, CDK4 y MDM2 estaban moderadamente sobreexpresados. Además, estudios recientes (444) muestran que el subgrupo de melanomas con niveles incrementados de CDK4

no presentan mutaciones en B-RAF ni en N-RAS, y son resistentes al inhibidor de B-RAF, SB590885; por otra parte, estos melanomas mostraron también sobre-expresión del receptor tirosín-quinasa c-kit “*wild-type*” (que no presentaba mutaciones), por lo que se sugiere que el tratamiento con imatinib podría ser adecuado (444).

3.3. Inhibidores de CDK (CKI)

Regulando la actividad de las CDK es posible regular la entrada de las células al ciclo celular: positivamente a través de su unión con las ciclinas, y negativamente por medio de su interacción con inhibidores de CDKs (CKI) (445).

3.3.1. CKI p16^{INK4}

La familia INK4 consta de cuatro proteínas, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}, polipéptidos de 15 a 19 kDa, homólogas en casi el 40% de su secuencia, y con propiedades bioquímicas y funcionales superponibles, aunque sólo p16 se ha relacionado directamente con su implicación en la carcinogénesis (446). La proteína p16, codificada por el gen supresor p16 (también llamado CDKN2, MTS1 e INK4a), se localiza en el cromosoma 9p21 (447). Dicha proteína se une de forma específica e inhibe la actividad catalítica de ciclina D/CDK4 (446). p16 es capaz de unirse a CDK4 tanto en presencia como en ausencia de ciclina D, y da lugar a la disociación de la ciclina D y de cualquier otro factor. En contraste con la formación de un complejo CDK4 activo, el ensamblaje del complejo p16-CDK4 es regulado únicamente por la cantidad de ambas proteínas (445). Dicha proteína funciona por tanto como un regulador negativo del ciclo celular y la alteración en su función favorece la progresión irreversible hacia la fase S del ciclo celular y por tanto la tumorigénesis. Deleciones (+/-, -/-), silenciamientos epigenéticos (por hipermetilación del promotor), y mutaciones en el locus INK4a/ARF (en la región cromosómica 9p21) (448) se han observado en una gran variedad de tumores (25- 70%): tumores de cabeza y cuello, de esófago, tracto biliar, pulmón, vejiga, colon y mama; leucemias, linfomas y glioblastomas (449). La transmisión en líneas germinales de alelos con p16 mutante da lugar a una predisposición hereditaria para el desarrollo de melanoma y de cáncer de páncreas e hígado.

El presente estudio demuestra una alta positividad de p16 en nevus congénitos (100%), nevus intradérmicos/compuestos (98%), nevus displásicos (100%) y nevus de Spitz (100%); que disminuye en melanomas en fase de crecimiento radial (94%), y vertical (89%). Aunque nuestro estudio no demuestra una diferencia significativa, la disminución de la expresión de p16 ha sido previamente demostrada por otros investigadores (450-453), que sí observan diferencias significativas (450,453) ($p=0.004$ (450)) en la expresión de p16 entre melanoma

primario “tempranos” (93% (450)), melanomas primarios avanzados (83% (450)) y melanomas metastásicos (38% (450)). Más aún, estudios previos también han demostrado una atenuación en la intensidad de la tinción progresiva entre nevus y melanomas (450,452,453).

Estos datos podrían explicar la detención en la proliferación de los melanocitos en los nevus p16-dependiente, que se conducirían hacia la senescencia (los melanocitos normales en la epidermis no expresan p16) y justificaría su consideración como gen de susceptibilidad en el melanoma (451), que supone una barrera hacia el desarrollo del mismo.

Aunque previamente se ha reconocido CDKN2A como diana génica en el melanoma familiar que iniciaría la transformación maligna (180-182), sin embargo la pérdida de la expresión de p16 no resulta significativa en nuestro estudio y resulta más evidente y significativa cuando el estudio incluye melanomas metastásicos, lo que sugiere que dicha pérdida no es un hecho inicial en la transformación melanocítica sino más distal en la progresión maligna (450). En un estudio genético reciente realizado con FISH (450) se detectaron índices elevados de pérdidas alélicas en la región cromosómica 9p21 (cuando se considera la región entera) en melanomas primarios y melanomas metastásicos (59% vs. 62%), niveles similares de deleciones en nevus displásicos (55%), mientras que sólo se detectaron en el 10% de los nevus comunes, lo que indica que estas alteraciones genéticas pueden ocurrir antes de la diseminación tumoral, como un hecho temprano en la patogénesis del melanoma. La alta incidencia en la pérdida de 9p21 en nevus displásicos frente a la baja incidencia de aberraciones cromosómicas en nevus melanocíticos comunes sugiere fuertemente que la pérdida de 9p21 puede jugar un papel en la proliferación y transformación melanocítica, que se mantendría posteriormente en las siguientes fases de progresión de la tumorigénesis del melanoma. Sin embargo, las deleciones alélicas que abarcan el locus CDKN, que están ausentes en los nevus comunes (0%), y muestran niveles bajos en nevus displásicos (9%), muestran un incremento significativo de su incidencia desde los melanomas primarios tempranos (7%) hasta los melanomas primarios avanzados (28%) y los melanomas secundarios (37%) ($p=0.018$). Aunque la deleción de dicho locus no implica la inactivación del gen p16, puesto que el segundo alelo es capaz de codificar una proteína funcional, durante la progresión del melanoma se observa una pérdida alélica del locus CDKN y de la expresión de la proteína p16^{INK4} desde los melanomas primarios tempranos y avanzados hasta los melanomas metastásicos, ausentes en lesiones melanocíticas benignas (224,450).

Todos estos datos sugieren que la progresión del melanoma corresponde a un modelo secuencial acumulativo de alteraciones genéticas, en el que las deleciones en 9p21 podrían jugar un papel en la transformación maligna e iniciación tumoral, mientras que la inactivación del gen p16 y los reordenamientos en el locus CDKN2A podrían contribuir a la progresión tumoral (450). Así, parece que la progresión tumoral y la formación de metástasis requieren la inactivación genética (mutación o deleción) o epigenética (silenciamiento génico) de ambos

alelos de CDKN2A (450). También se ha relacionado la pérdida de p16^{INK4} con una menor supervivencia (265).

3.3.2. CKI p21^{CIP1/WAF1}

La familia KIP/CIP (*CDK interacting protein/ Kinase inhibitory protein*) incluye tres proteínas, estructuralmente relacionadas entre sí, p21, p27 y p57, y presenta una más amplia especificidad que la familia INK4, ya que sus miembros interactúan e inhiben la actividad quinasa de los complejos ciclina E/CDK2, ciclina D/CDK4, ciclina D/CDK6, ciclina A/CDK2 y ciclina B/CDK2 y actúan a lo largo del ciclo celular (454). p21 fue descubierto simultáneamente por varios grupos como: diana activada por p53 (*WAF1 wild-type p53 activated factor*), como inhibidor del complejo ciclina-CDK (*CIP1 CDK interacting protein*), como proteína expresada en fibroblastos en la senescencia (*SDI1 senescent cell-derived inhibitor*) y como MDA-6 (*melanoma differentiation associated*) (454). El gen humano p21, localizado en el cromosoma 6p21, codifica una proteína de 164-166 amino-ácidos, de 21 kDa, con funciones múltiples y ocasionalmente contradictorias que dependen de su localización y concentración (454). En su localización nuclear, p21 funciona como inhibidor de CDK (CKI), induciendo la detención del ciclo celular en respuesta al ADN dañado (inducido a su vez por la proteína p53). También en esta localización desarrolla sus funciones de promoción de la diferenciación y senescencia celular. Estos efectos anti-proliferativos de p21 están en parte asistidos por su capacidad de interacción con la proteína PCNA que bloquea el proceso de síntesis del ADN (requerido para la fase S del ciclo celular) (454). Por otra parte, p21 también puede jugar un papel pro-proliferativo y de supervivencia celular, cuando está localizado (al menos inicialmente) en el citosol. p21 facilita el ensamblaje de las ciclinas de tipo D con CDK4 y CDK6, y su traslocación al núcleo, impidiendo su posterior exportación del núcleo. Por tanto, favorece la acumulación de elevados niveles de complejos ciclinas D/CDK activos para iniciar la fosforilación de la proteína del Retinoblastoma; y, promueve la progresión celular a través de la fase G1 del ciclo celular. De forma similar, p21 promueve la activación del complejo ciclina B/CDK1 durante la transición G2/M. La p21 citoplásmica puede, además, bloquear la apoptosis mediada por Fas uniéndose y evitando la activación de la procaspasa-3 e inhibiendo a la proteína quinasa ASK1 pro-apoptótica en el citosol. Esta división núcleo/citoplásmica de las funciones de p21 alcanza otras áreas de actividad de la proteína p21. La proteína p21 nuclear puede regular una variedad de respuestas transcripcionales y cambios en el estado de metilación del ADN. Además, la estabilidad de p21 puede estar influenciada por su localización subcelular y/o las proteínas asociadas (proteínas reguladoras del ciclo celular; la vida media de p21 es relativamente corta, menos de una hora, permitiendo a la célula responder de forma rápida a los estímulos) (454).

La alteración de la función de proteínas como el Rb, o p16, o la sobreexpresión de ciclina D o CDK4 son hechos frecuentes en los tumores humanos, sin embargo las mutaciones en p21 son extremadamente raras (455). Y, aunque inicialmente se sugirió que en ratones desprovistos de p21, el desarrollo era normal, estudios recientes han indicado que estos ratones desarrollan tumores espontáneos a una edad media de 16 meses, lo que subraya la importancia de este gen en la supresión tumoral (455). Sin embargo, en determinados contextos (p.e. en el músculo liso o en células endoteliales), se produce un efecto paradójico cuando p21 es reprimido, dando lugar a la parada del ciclo celular como consecuencia de la disminución de la formación de complejos ciclina D-CDK4/CDK6 (455).

En relación con las lesiones melanocíticas, hemos observado que sólo el 5% de los nevus intradérmicos/compuestos y ninguno de los casos de nevus congénitos (0%) expresan la proteína p21. Estos datos coinciden con los escasos estudios realizados con p21 sobre lesiones melanocíticas benignas (310,453,456). En nevus displásicos, hemos observado positividad hasta en el 39% ($p/D < 0.05$) de nuestros casos, mayor expresión que en estudios previos, en los que la expresión de p21 varía entre 10% (310) y 20% (453). Estas diferencias podrían explicarse por el pequeño número de casos estudiados en cada serie (12 (310) y 15 casos (456)). Por otra parte, en melanomas se observa positividad moderada: 21% - 27% (fase de crecimiento radial y vertical respectivamente) con una diferencia significativa ($p/R < 0.05$) frente a nevus comunes, que se observa también en estudios previos (310,453,456), aunque con variaciones en la positividad, que relacionamos con los puntos de corte escogidos en cada estudio. Recientemente, nuevos estudios (224,441) han demostrado ganancias genéticas (incremento del número de copias) en la región 6p hasta en el 37,1% de los melanomas. Más aún, existe una fuerte asociación entre la expresión de p21 y el nivel de invasión (espesor de Breslow y nivel de Clark, $p < 0.01$) (453), y se ha demostrado el valor pronóstico de p21 en melanomas primarios (265). Estos resultados, podrían ser explicados por varios mecanismos: estímulos microambientales (independientes de la vía de p53), adaptación de los puntos de control del ciclo celular al estímulo constante de p21, mutación de p21 con alteración de su función, alteración o inhibición de la unión de p21 a los complejos ciclina/CDK, alteración o una degradación anormal de la proteína (310). Ninguno de estos mecanismos ha sido confirmado por el momento. Nuevos estudios serán necesarios para dilucidar la función de p21 en la progresión del melanoma.

En nevus de Spitz hemos observado hasta un 91% de positividad, significativamente mayor ($p < 0.05$) que en nevus comunes y que en melanomas. Estos datos coinciden con estudios previos (453,457,458), que sugieren que los nevus de Spitz son lesiones con comportamiento biológico "border-line" entre los nevus comunes (bajo índice de proliferación Ki-67, y alta positividad de p16) y los melanomas (alto nivel de p21) (457). Aunque también se especula que en estos casos, p21 sea un ejemplo de oncogén-inductor de senescencia (458).

En nuestro estudio, los nevus de Spitz han mostrado altos niveles de ciclina D1 (incluso superiores que la de los melanomas) y baja actividad proliferativa, con muy altos niveles, tanto

de p16 como de p21, resultados que nos hacen pensar en el peso específico relativo de estos inhibidores del ciclo en la senescencia de los nevus de Spitz.

3.4. p53, el guardián del genoma

El gen p53 localizado en el brazo corto de cromosoma 17 (17p1.3), da lugar a la proteína p53 (de 393 aa) (459), descrita por primera vez en 1979 como un oncogén, debido a su capacidad de unión al antígeno T del virus SV40 y de transformar células en cultivo (47). Diez años después, el grupo de Levine (460) atribuía a esta proteína su verdadera función fisiológica, la de suprimir la formación de tumores; p53 desempeña una función crítica en los mecanismos de respuesta celular frente al daño o mutación en el genoma (459), evitando la entrada prematura en la fase S, actuando como activador transcripcional de genes específicos como p21, retinoblastoma, E2F, PCNA y Gadd45 (459). En condiciones fisiológicas (estado latente de p53) presenta unos niveles de expresión indetectables en algunos tipos celulares, que aumenta rápidamente en respuesta a diferentes estímulos (daño directo al ADN, depleción de ribonucleótidos, hipoxia, golpe de calor, exposición a monóxido de nitrógeno y radiación). Este incremento rápido de los niveles de p53 se produce por un mecanismo post-transduccional, de forma que cambios en el rango de transcripción desempeñan un papel menor, aunque no irrelevante. La rápida disminución de los niveles de proteína p53 se lleva a cabo en su mayor parte, a través de la vía de señalización ubiquitina-proteosoma (459).

Casi la mitad de los tumores humanos presentan mutaciones en el gen p53, y el 20% de estas mutaciones están concentradas en 5 codones, habiéndose descrito hasta 18.585 mutaciones somáticas (82% corresponden a mutaciones puntuales, el 9% a deleciones) y 225 mutaciones en la línea germinal (459). Las mutaciones de p53 son el resultado de un cambio “de sentido”, que provoca cambios conformacionales en la proteína, aumentando su estabilidad aunque pierde su actividad; mientras que otros genes supresores de tumores mutados en algunos tipos de cáncer, como el Rb y la APC, presentan mutaciones “sin sentido”, que dan lugar a una proteína trunca. En una gran variedad de cánceres (carcinoma de próstata, carcinoma escamoso de cabeza y cuello, carcinomas colorrectales, carcinoma de mama, melanoma) la inmunopositividad de p53 se asocia a peor pronóstico (459).

En nuestro estudio, la expresión de p53 revela negatividad en nevus congénitos (0%), ligera-moderada positividad en nevus adquiridos intradérmicos/compuestos (17%), y moderada en nevus displásicos (39%). Se observa mayor expresión en nevus de Spitz (77%), y en melanomas (79%-82% en fase de crecimiento vertical y radial respectivamente). Sin embargo, el resultado de la expresión de p53 en lesiones melanocíticas en la literatura ha sido controvertido. Aunque, la mayoría de los estudios reconocen la ausencia de expresión de p53 en nevus comunes (461,462), existen estudios que muestran positividad leve (7-33%)

(265,453,463,464). En relación con los nevus displásicos, también se han observado resultados variables, algunos estudios muestran negatividad para p53 (465), y otros positividad discreta (hasta 25%) (466). Estas diferencias podrían ser explicadas por la variabilidad en la técnica o, podría reflejar simplemente las fluctuaciones de la proteína p53 durante el ciclo celular (461,463). Por otra parte, se ha observado una amplia expresión de p53 en melanomas, lo que coincide con la mayoría de los estudios previos (461), aunque estos también muestran una importante variabilidad. Algunos estudios han demostrado intensa positividad para p53 en melanomas primarios, hasta en el 92-100% de los casos (461,467), mientras que otros autores han observado frecuencias mucho más bajas (7-27%) de inmunoreactividad (461,468). Algunos describen incluso negatividad en la expresión de p53 en algunos melanomas (462). Estas diferencias podrían explicarse en parte por las diferencias metodológicas (sensibilidad del anticuerpo, sensibilidad de los métodos de visualización y los criterios de positividad en cada caso (positividad nuclear (462) vs. positividad nuclear/citoplásmica (467)) y los puntos de corte), y la existencia de diferentes mecanismos que pueden dar lugar a la estabilización y acumulación de proteína p53 natural o mutante. La expresión de p53 también varía considerablemente según la localización de la lesión, generalmente más frecuente y más intensa en lesiones sobre piel crónicamente expuesta al sol (461), esto podría estar en relación con el papel de la radiación UV en la etiología y patogénesis del melanoma (461), la heterogeneidad genética de las lesiones, y la expresión de la proteína natural y de varias proteínas mutantes en el mismo tumor (224,461).

Las mutaciones de TP53 en lesiones melanocíticas no son muy frecuentes (461), aunque existe también variabilidad en los resultados según el estudio y se han observado alteraciones genéticas en TP53 hasta en el 1-11% y 20-25% en melanomas primarios y metastásicos respectivamente (461). Comparándolos con tumores cutáneos no-melanomas (10-90%) y tumores profundos (80%), la frecuencia de dichas mutaciones es mucho menor y los sitios de las mutaciones son diferentes, lo que sugiere que aunque las mutaciones en TP53 están implicadas en el desarrollo de algunas lesiones melanocíticas, su papel no es tan importante como en otros tumores. Además, estudios centrados en nevus comunes y en nevus displásicos demuestran que también pueden existir mutaciones en TP53, pero con menor frecuencia (0-18%) que en melanomas (461). Se han observado las mismas mutaciones relacionadas con la radiación UV (C:G por T:A). También se han demostrado mutaciones silenciosas en nevus congénitos, benignos y displásicos (461). Mientras en tejidos normales existen escasas moléculas de proteína p53 natural "wild-type", localizadas predominantemente en el núcleo, con una vida media corta (6-20 min.), la proteína mutante puede aparecer tanto en el núcleo como en el citoplasma, funcionando como oncoproteína positiva o negativa, invalidando la función de la proteína natural (461). La proteína mutante además puede formar un oligómero con la proteína natural formando complejos inactivos con una vida media prolongada, y dando lugar a una proteína con conformación mutante (469). Dichas mutaciones

genéticas pueden estabilizar la proteína mutante incrementando su vida media (6-24 horas) con acumulaciones tanto de la proteína natural como de la mutante, que se detectan inmunohistoquímicamente. Los mecanismos subyacentes incluyen no sólo los eventos mutacionales, sino también la unión de p53 a otras proteínas virales o celulares (como MDM2), modificaciones post-traslaciones de la proteína en ausencia de alteraciones genéticas, y posibles alteraciones no conocidas por el momento que afectan a la expresión de p53 (469).

La mayor frecuencia de sobreexpresión de p53 en melanomas frente a la escasa positividad en nevus sugiere que la expresión de p53 en nevus simplemente refleja las fluctuaciones de la proteína en los puntos de control del ciclo celular, y no está relacionada con defectos genéticos (461,463). El importante incremento en la sobreexpresión de p53 es generalmente un evento tardío en la progresión del melanoma, consecuencia de la transformación oncogénica (461,465); estas diferencias podrían en parte explicar el diferente comportamiento biológico en nevus y melanomas (461). Se ha observado mayor frecuencia de positividad de p53 en melanomas metastásicos que en melanomas primarios (240,36), con mayor porcentaje de positividad celular con la progresión tumoral (nevus benigno→nevus displásico→melanoma fase de crecimiento radial→melanoma fase de crecimiento vertical→melanoma metastático) (461,462,463,470) y con el mayor espesor tumoral (470). También se ha correlacionado la expresión de p53 con parámetros clínicos: ulceración tumoral, actividad mitótica, nivel de invasión, infiltración linfática y supervivencia (461).

En resumen, la detección inmunohistoquímica de sobreexpresión de p53 en melanomas no siempre refleja la presencia de mutaciones genéticas de TP53, por lo que otros mecanismos moleculares u otros componentes de la vía de p53 podrían estar implicados en la sobreexpresión de dicha proteína (461). Aunque ampliamente reconocido en una gran variedad de tumores, por el momento no se conoce el papel de la proteína p53 en el desarrollo del melanoma y son necesarios futuros estudios.

3.5. Proteína del Retinoblastoma

La pérdida de la heterocigosidad en un locus llamado RB1 junto con el desarrollo del retinoblastoma condujo al descubrimiento de la existencia de un gen que predispone al desarrollo del retinoblastoma. La proteína del retinoblastoma es el miembro fundador de una familia de proteínas denominadas "*pocket proteins*", que además de pRB, incluye otras dos proteínas relacionadas, p107 y p130, y que poseen un dominio "*pocket*" o "bolsa" que presenta una alta homología estructural y funcional entre proteínas (471). El gen RB1, localizado en el cromosoma 13q14.2 se traduce en una fosfoproteína nuclear (pRB), de 105-110 kDa (471), que se expresa en todos los tejidos del organismo, pero con heterogeneidad en su expresión dependiendo del estrato celular en donde se observe, del estado de maduración celular o de la

fase del ciclo celular en que se encuentre la célula (471).

El gen supresor RB actúa sobre la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. pRB ejerce su control en el ciclo celular regulando y secuestrando una serie de proteínas reguladoras (factor regulador E2F) que favorecen la proliferación celular (472), un requisito previo para asumir la diferenciación. En la actualidad, varios estudios han demostrado que la pérdida de pRB se correlaciona con la aparición de un fenotipo apoptótico, demostrando que pRB tiene una función protectora frente a la apoptosis (472).

El gen del RB es el responsable de la predisposición al retinoblastoma, donde se han observado frecuentemente delecciones de segmentos del cromosoma 13, que contienen el locus RB. Los tumores humanos más comunes muestran frecuentemente alteraciones en la estructura del gen RB lo que produce una inactivación o pérdida de su función. Así, ocurre en el carcinoma de células pequeñas y de células grandes de pulmón, cáncer de mama, sarcomas osteogénicos, leucemias, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de vejiga, y gliomas malignos (473).

En relación con los tumores melanocíticos, nuestro estudio demuestra una expresión nula o escasa en nevus melanocíticos comunes, (0% y 5% respectivamente en nevus congénitos y nevus intradérmicos); expresión leve en nevus displásicos (20%), y un importante incremento en los niveles de expresión en melanomas en fase de crecimiento radial (75%; $pI/R=0.000$) y vertical (74%; $pI/V=0.000$). En el pasado, existió cierta controversia acerca de la expresión de pRb en lesiones melanocíticas: así, mientras que Korabiowska *et al.* (474) postulaban que existía una disminución de la expresión de pRb durante la progresión del melanoma, Maelandsmo *et al.* (475) y Saenz-Santamaría *et al.* (476) observaron un importante incremento de pRb en melanomas primarios y melanomas metastásicos (con cierta variabilidad en los resultados que podrían explicar las cuestiones técnicas). Más recientemente, Roesch *et al.* (477) han demostrado un importante incremento de los niveles de expresión de pRb en melanomas por dos métodos independientes, “*real-time*” RT-PCR, e inmunohistoquímica, coincidiendo con nuestros resultados. En este último estudio (477), los autores demuestran además, la hiperfosforilación pRb, que probablemente mantiene en estado inactivo la función supresora de esta proteína. Así, se observa mayor intensidad de fosforilación de pRb en regiones tumorales con mayor actividad de crecimiento expansivo, las zonas más profundas en melanomas de crecimiento vertical de melanomas nodulares, y áreas laterales subepidérmicas en melanomas de extensión superficial, mientras que las lesiones benignas muestran escasa-moderada expresión de pRb y de p-RB fosforilada, que se expresa de forma homogénea en toda la lesión (477).

En relación con los nevus de Spitz, se observa mayor expresión de pRB (65%) que en nevus comunes ($pI/S<0.05$) y nevus displásicos ($pS/D<0.05$), estos datos podrían explicarse también por el estado de fosforilación de la proteína. Nuevos estudios en el futuro podrían

aclarar los detalles del estado de fosforilación de dicha proteína en nevus y melanomas.

4. Proteína inhibidora de la apoptosis: Survivina

Recientemente, se ha identificado una nueva familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) clave para la regulación de la apoptosis en diversos fenómenos biológicos como en la resistencia a las terapias contra el cáncer, con varios miembros altamente conservados durante la evolución como IAP-1, IAP-2, XIAP, NIAP y Survivina (478). De las diferentes IAPs, la survivina es la más pequeña de 16.5 kDa (142 aa) y está codificada por un gen localizado en la región telomérica del cromosoma 17.

La survivina se expresa con un patrón dependiente del ciclo celular en la fase de mitosis (G2/M). Se observa expresión de survivina durante el desarrollo embrionario y fetal, pero es prácticamente indetectable en tejidos adultos con diferenciación terminal. Posteriormente, la survivina se vuelve a expresar en líneas celulares transformadas y en la mayoría de células de los tumores humanos más frecuentes: 34-100%, particularmente en colon, pulmón, mama, SNC y melanoma (479). Algunos tipos de tumores muestran una sobreexpresión de survivina como un hecho temprano, incluso en lesiones pre-invasivas. Por ejemplo, la survivina es indetectable en lesiones hiperplásicas de colon, pero se observa expresión en el 2.3% de las displasias de bajo grado, en 52.4% de las displasias de alto grado y en 63% de los adenocarcinomas colorrectales *in situ* (480).

En nuestra serie, las lesiones melanocíticas benignas (nevus congénitos, intradérmicos, displásicos y nevus de Spitz) no presentan expresión de survivina nuclear (0%). Sin embargo, se observa un importante incremento de su expresión en melanomas en fase de crecimiento radial (29%, $p/R < 0.05$), y sobretodo en melanomas en fase de crecimiento vertical (68%; $pR/V < 0.05$). Estos resultados coinciden con estudios recientes (265,481,482).

El papel de la survivina en la formación y progresión de procesos tumorales está relacionado con su capacidad para inhibir la apoptosis y para promover tanto la proliferación celular como la angiogénesis. Además de su demostrado papel en la inhibición de la apoptosis por su unión directa a las caspasas 3 y 7, inhibiéndolas o a Smac/DIABLO (proteína mitocondrial, pro-apoptótica que participa en la activación de la caspasa-9) (478,479), la survivina también juega un papel importante en la regulación de la progresión de la mitosis. Es más, algunos autores han sugerido que el principal papel de la survivina es el control de la división celular. La survivina contribuye a establecer la segregación de las cromátidas hermanas de forma precisa y la estabilización de los microtúbulos en las fases tardías de la mitosis (478). Además, también promueve la angiogénesis, lo que está estrechamente relacionado con su capacidad de inhibición de la apoptosis en células endoteliales aumentando la supervivencia

celular (478). En este contexto, resulta útil aclarar que la survivina existe en dos "pools": citosólico 80% y nuclear 20% (478). La fracción citosólica incluye la survivina asociada a los centrómeros, microtúbulos, otros componentes del aparato mitótico (481), y a la mitocondria (con capacidad de inhibir la vía intrínseca de la apoptosis interfiriendo los efectos post-mitocondriales), mientras que la fracción nuclear se localiza en los quinetocoros de los cromosomas en metafase (481). La survivina juega un papel importante como regulador en varias de las fases de la mitosis (483). El incremento en los niveles de survivina que se observa en muchos de los tumores malignos podría relacionarse con una actividad mitótica aberrante (481). Así, la expresión de survivina nuclear en lesiones melanocíticas benignas en la mayoría de los trabajos previos y en nuestro estudio es negativa: tanto en nevus adquiridos comunes (481,482), como en nevus displásicos (481,482), y de Spitz (482); y, sin embargo, en melanomas se observa una mayor positividad (variable: 29-67%) (481,482,484). Existe, por tanto, una importante diferencia en la expresión nuclear de survivina entre las lesiones melanocíticas benignas y los melanomas, lo que podría ser de ayuda en el diagnóstico diferencial histológico entre nevus y melanomas (265,481,482). En el núcleo, la survivina juega un papel en la división celular mediante su asociación a la Aurora B, y la proteína interior del centrómero (484). Se ha observado que la sobreexpresión de survivina en el núcleo ocasiona una disminución de la fase G₀/G₁ y un incremento en la fase S; y la translocación al núcleo de la survivina coincide con el cambio a la fase S, mientras que la prevención de su traspaso al núcleo impide el paso a la fase S (485). Así, la translocación nuclear de survivina se relaciona con eventos mitóticos y la proliferación celular. Además, recientemente se ha demostrado que la expresión de survivina nuclear es un factor independiente significativamente asociado a una menor supervivencia en melanomas (484), así como en una gran variedad de tumores (481). Representa pues, un importante marcador pronóstico que permite seleccionar a los pacientes susceptibles de recibir terapias adyuvantes. Es pues, una excelente diana terapéutica, relacionada con la patogénesis y la progresión del melanoma (484).

Por otra parte, aunque en nuestro estudio no se ha valorado, la mayoría de estudios demuestran que existe expresión citoplasmática de survivina tanto en lesiones melanocíticas benignas (481,486), como en melanomas (481,484,486), sin observarse diferencias significativas (481). Para el crecimiento de las lesiones melanocíticas, la proliferación debe predominar sobre la apoptosis; pero la persistencia de un nevus establecido requiere la reducción de la apoptosis, cuando el índice de proliferación disminuye (486). Además, se ha demostrado que los melanocitos névicos son más resistentes a la apoptosis que los melanocitos normales (487), lo que sugiere que esta resistencia a la apoptosis esté mediada por inhibidores de la apoptosis. La survivina citoplásmica parece contribuir a la mayor resistencia a la apoptosis en los melanocitos névicos, más que a la proliferación, puesto que además es el único inhibidor de la apoptosis que se expresa en nevus (481,488).

En resumen, la expresión nuclear de la survivina muestra una diferencia significativa entre lesiones melanocíticas benignas y el melanoma, lo que sugiere su implicación en fases tardías de la evolución del melanoma, con un importante papel en la progresión de la mitosis.

5. Marcador de proliferación Ki-67

Ki-67 es una proteína nuclear no-histona, de 395 kD (489,490), que se detecta en las células que entran al ciclo celular (fases G1, S, G2 y mitosis), pero no en G0. La naturaleza exacta de este antígeno nuclear, codificado por un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25) (491), se desconoce, pero puede hallarse libre o asociado al ADN (490,491). Tampoco se conoce por el momento su función exacta (490), pero los datos sugieren que tiene un papel fundamental en la proliferación celular (490).

En la actualidad, la medición de la tasa de expresión del antígeno Ki-67 es uno de los métodos más usados para determinar el índice de proliferación, lo que permite correlacionar la tasa proliferativa tumoral con variables clínico-patológicas. La expresión de Ki-67 se correlaciona con otros índices de proliferación celular, tales como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), y la medición de la fracción S+G2-M mediante citometría de flujo e incorporación de timidita tritiada y bromodeoxiuridina (491). El anticuerpo más ampliamente utilizado para su detección es el MIB-1 (*"Molecular Immunology Borstel"*) sobre tejido fijado e incluido en parafina, y muchos estudios han demostrado un valor pronóstico de este marcador en una gran variedad de tumores (ej. próstata, mama, neuroblastoma, mesotelioma, etc), e incluso predictivo en tumores prostáticos (490). Ki-67 también puede considerarse una herramienta diagnóstica en linfomas (nos permite distinguir entre linfoma folicular e hiperplasia folicular reactiva) (490).

Nuestro estudio ha demostrado una diferencia importante en su expresión y patrón de distribución entre lesiones melanocíticas benignas y melanomas: con escasa o nula inmunoreactividad de los nevus (nevus comunes, nevus de Spitz y nevus displásicos) (0%), y un incremento en su expresión en melanomas en fase de crecimiento radial (6%; aunque no se observan diferencias significativas con los nevus) y sobre todo en fase de crecimiento vertical (37%; $p/V < 0.05$). Estos datos coinciden con estudios previos (482,492,493,494) que muestran mínima expresión en nevus compuestos (<2%) (482,492), en nevus displásicos (<2%) (482), y en nevus de Spitz (<3%) (482,492), y mayor expresión en melanomas (10-30%) (482,492). Además, las escasas células teñidas en nevus se localizan en zonas más superficiales, mientras que en melanomas tienden a disponerse con patrón heterogéneo, en todos los niveles del tumor, lo que podría explicarse por el proceso de maduración en los nevus. Las ligeras diferencias observadas entre estos estudios y el nuestro se deben en parte al punto de corte seleccionado

y, en relación con los melanomas, a que estos estudios no distinguen diferentes fases de progresión en el melanoma, y que frecuentemente, las series estudiadas son más cortas.

Aunque estos datos indican que la expresión de Ki-67 puede ser útil en la discriminación entre lesiones melanocíticas benignas y malignas (482), existe cierta controversia sobre el posible papel diagnóstico de Ki-67. Kaleem *et al.* (494) demostraron una expresión alta de Ki-67 en melanomas nodulares, pero observaron una frecuente ausencia de actividad proliferativa en melanomas de extensión superficial, en melanomas lentiginosos y en melanomas asociados a nevus, sugiriendo que la expresión de Ki-67 puede ser muy variable en los melanomas, y que una expresión baja de Ki-67 sólo no es suficiente para descartar un melanoma. Por otra parte, algunos nevus, en particular los nevus de Spitz presentan un nivel de expresión de Ki-67 relativamente alto, alcanzando hasta 7-12% en algunos estudios (482).

Finalmente, varios estudios han demostrado que la expresión de Ki-67 puede ser un valioso vaticinador de la progresión de las lesiones melanocíticas (495), y un factor pronóstico significativo, aunque no independiente (490,495). El índice mitótico (mitosis/campo de gran aumento) ha resultado ser más útil, al demostrar ser un factor pronóstico independiente en el melanoma, siendo el segundo marcador pronóstico en importancia después del espesor tumoral (495). Esta diferencia entre el Ki-67 y el índice mitótico se debe a que, por una parte, MIB-1 tiñe células que están bloqueadas en el ciclo celular justo antes de la fase de mitosis, o cuyo ciclo celular se ha alargado, y que no son activamente proliferativas, y por otra parte, el incremento del número de mitosis en casos con pronóstico pobre puede ser consecuencia de la alta proporción de células aneuploides (495).

6. SISTEMA MMR (“MISMATCH REPAIR”)

Los genes de reparación de errores de apareamiento replicativos (MMR genes), conocidos como “*mismatch repair genes*”, codifican enzimas que intervienen en uno de los mecanismos de reparación del ADN que consiste en detectar y reparar errores en el apareamiento de las dos hebras del ADN por falta de complementariedad en sus secuencias, que generan pequeños bucles en una de las hebras de ADN. Estos errores son comunes en las zonas muy repetitivas del ADN.

Los microsatélites son secuencias de ADN de longitud variable (generalmente cortas), constituidas por uno (mononucleotídicas) o dos (dinucleotídicas) nucleótidos que se repiten un número variable de veces. Se hallan repartidos por todo el genoma y pueden encontrarse dentro o fuera de los genes (496). La inestabilidad de microsatélites (MSI) es causada por un fallo en el sistema de apareamientos (cometidos por la enzima ADN polimerasa) en el ADN, generando que la hebra replicada varíe en el número de repeticiones con respecto a la hebra molde. Este error replicativo es reparado por los genes MMR. La inestabilidad de microsatélites

puede ser el resultado de un defecto funcional de los genes de reparación del ADN alterado, dando lugar a inserciones o deleciones de un nucleótido o más, o la substitución de una base por otra, como se ve en los pacientes con Carcinoma Colorrectal Hereditario Sin Poliposis (CCHSP) (497,498). En las células normales (sin fallos en los genes MMR), la longitud de las repeticiones microsatelitarias es constante.

Las proteínas implicadas en el proceso MMR están muy conservadas evolutivamente, lo que pone de manifiesto la importancia de este tipo de reparación para mantener la integridad del genoma en todos los organismos, desde bacterias a eucariotas superiores (400,500). En el hombre, los principales complejos MMR están compuestos principalmente por proteínas homólogas de las proteínas bacterianas *mutL* y *mutS* (501). Se han identificado genes homólogos de MutS en células eucariotas que forman dos heterodímeros: MutS α (MSH2/MSH6) y MutS β (MSH2/MSH3) (502); y homólogos de MutL que interaccionan para formar dos heterodímeros, (MLH1/PMS2) y (MLH1/PSM1) (503,504). Este sistema funciona siguiendo un proceso post-replicativo de excisión-resíntesis de una porción de la molécula de ADN que comprenda una alteración en el apareamiento de las bases (505). En su función acopladora, la unión y la hidrólisis de ATP facilita las interacciones entre las proteínas y el deslizamiento a lo largo del ADN (506). Aunque el mecanismo por el cuál se detectan las cadenas erróneas es desconocido incluso en bacterias (*E.coli*), se ha demostrado la implicación de exonucleasas (las ADN polimerasas δ y ϵ) (507), la acción coordinada de la ADN-polimerasa δ , y posiblemente otras ADN-polimerasas (508) para la resíntesis de la cadena cortada y la ADN-ligasa (que no ha sido aún identificada) que completa la acción de MMR.

La frecuencia de las alteraciones genéticas de las secuencias de microsatélites del ADN en algunos cánceres de colon en el hombre ha conducido a postular la existencia de anomalías en el funcionamiento del sistema MMR. Esta hipótesis ha sido confirmada con el síndrome de Lynch (509) o el síndrome HNPCC ("*Hereditary non polyposis colorectal cancer*"), aunque también pueden verse afectados tumores esporádicos. Los principales tejidos caracterizados por la inestabilidad de microsatélites son: el tejido colorrectal, estómago y endometrio. El HNPCC se asocia con mutaciones germinales en 5 genes del sistema MMR: MSH2, MSH6, MLH1, PSM1 y PSM2 (510-514); estos pacientes suelen tener una mutación heterocigota en uno de los genes MMR, y desarrollan cáncer después de 4 décadas de vida (514,515). La MSI sólo aparece en los tumores y no en el tejido normal de los mismos pacientes, lo que indica que la pérdida o la inactivación del alelo normal es necesario para acelerar el proceso de tumorigenesis estableciéndose así un *fenotipo mutador de carácter recesivo* (516).

La forma de identificar la deficiencia del mecanismo de MMR es estudiar la expresión de las proteínas reparadoras en el tumor de los pacientes por la técnica de inmunohistoquímica. El grupo de Wilson *et al.* (517) fueron los primeros en utilizar anticuerpos frente a la proteína MSH-2 y más tarde se describió el uso de anticuerpos frente a las proteínas MLH-1 y MSH-6. A partir de este momento se publicaron muchos estudios sobre el uso de la inmunohistoquímica, sobre todo en familias sospechosas de ser HNPCC. La mayoría de estos estudios han demostrado que la pérdida de expresión detectada por esta técnica se

correlaciona muy bien con la presencia de una mutación germinal en MMR (518-522), aunque se debe tener en cuenta que la ausencia de expresión de la proteína MLH-1 no siempre se debe a mutaciones en el gen, sino que puede deberse a la hipermetilación en el promotor del mismo (p.e. en los tumores esporádicos con inestabilidad a microsatélites) y se observa también en tumores colorrectales de individuos de edad avanzada (522,523).

Por otra parte, en el año 1998 se establecieron unas guías internacionales para la evaluación de MSI, comunicando a la comunidad investigadora internacional la utilización de un panel de 5 microsatélites en el estudio (524). En estos marcadores están incluidos tres microsatélites con repeticiones de dos nucleótidos D5S345, D2S123, y D17S250, y dos microsatélites con repeticiones de un solo nucleótido BAT25 y BAT26. Si dos de los cinco microsatélites muestran inestabilidad (ganancias o pérdidas en el número de repeticiones), se considera que ese tumor tiene alta inestabilidad y se denomina *MSI-H (high frequency MSI)*. Si sólo hay inestabilidad en uno de los marcadores, entonces se dice que el tumor tiene baja inestabilidad y se le denomina *MSI-L (low frequency MSI)* (524). Un tumor que no presenta inestabilidad para ningún marcador se dice que es estable y se le denomina *MSS*. El fenotipo H-MSI se observa en la mayoría de los tumores HNPCC y en algunos cánceres esporádicos con MSI. El fenotipo L-MSI se observa principalmente en tumores esporádicos, y en una minoría de tumores HNPCC.

En nuestro estudio valoramos la expresión de las proteínas nucleares MLH-1 (gen localizado en el cromosoma 3p21) y de MSH-2 (cromosoma 2p22-21). El estudio inmunohistoquímico revela una intensa expresión nuclear en piel normal, particularmente en la epidermis y estructuras anexas (control positivo). En nevus melanocíticos se observa una alta expresión de MMR (93-100%), con alta proporción de células positivas. En melanomas hemos observado una reducción de la expresión, con un patrón heterogéneo, especialmente en la expresión de MLH-1 en melanomas en fase de crecimiento radial (71%; $p/R < 0.05$), lo que indica la presencia de subgrupos o clones celulares con escasa o nula expresión de MMR. En los melanomas en fase de crecimiento vertical, se observa intensa positividad para MLH-1 (98%) y MSH-2 (100%). Nuestros resultados coinciden con los hallados en estudios previos, aunque existe importante variabilidad (525-529).

Aunque, muchos de los estudios previos se han centrado tanto en la expresión de las proteínas (MMR), como en la inestabilidad de los microsatélites (525-528). Todos los estudios (525,527,529) demuestran inmunopositividad para MLH-1 y MSH-2 en lesiones melanocíticas benignas y malignas, con una alta expresión de MMR (80-90%) en nevus melanocíticos con intensa inmunopositividad y alta proporción de células positivas y ligera reducción de su expresión en melanomas (55-75%), que muestran un patrón heterogéneo (527). Existe cierta variabilidad en los resultados, debida a razones técnicas (anticuerpos utilizados, al punto de corte establecido), a que frecuentemente se trata de series cortas (9 casos de melanomas, el grupo de Hussein (527)), a que muchos de los estudios se llevan a cabo sobre líneas celulares (525) y no siempre se especifican las diferentes fases en la progresión del melanoma (527).

También, se ha demostrado una mayor disminución de la expresión de dichos marcadores en melanomas metastásicos (MLH-1: 60% y MSH-2: 91% (265)).

Así, muchos estudios también sugieren la implicación de la alteración de los microsatélites en la carcinogénesis del melanoma, por el hallazgo de inestabilidad de microsatélites en melanomas primarios (530,531) y en melanomas secundarios (532). Se ha observado MSI en melanomas cutáneos primarios con porcentajes que varían de 2% a 30% (525,526,530,531,532) y en lesiones metastásicas (20% a 70%) (525,532), valores significativamente diferentes a los de los nevus melanocíticos que no muestran MSI (525-527), aunque, sí se ha observado en nevus melanocíticos displásicos (526-528), que a su vez se correlaciona con el grado de atipia (11% con atipia leve a 45% con atipia severa) (526) y no muestra diferencias significativas con los melanomas primarios (526). Las diferencias observadas entre los distintos estudios, pueden deberse entre otros factores a la heterogeneidad genética de los melanomas, o reflejar la utilización de diferentes marcadores de microsatélites. La mayoría de estos estudios revelan un fenotipo L-MSI en melanomas y nevus displásicos (526,527,529,534); el fenotipo H-MSI ha sido observado raramente en algunos de estos tumores (525,532). Se considera el patrón *high*-MSI, cuando la inestabilidad de los microsatélites es >30% de los marcadores testados, generalmente asociado con mutaciones en los genes MMR; los tumores con una inestabilidad <30% de los marcadores estudiados tienen un patrón *low*-MSI, y los mecanismos biológicos asociados son aún desconocidos. Todo esto sugiere, que la MSI se adquiere en una fase temprana de la progresión hacia el melanoma y persiste después de la transformación celular inicial.

Estos hallazgos que muestran que la expresión MMR está preservada en lesiones melanocíticas L-MSI, y que no se observa una diferencia significativa en los valores de expresión de MMR entre los melanomas MSI y MSS (527) se puede relacionar con: 1. la mayoría de estos tumores mantienen genes MMR funcionales; 2. algunos tumores pueden tener mutaciones “sin sentido” en genes MMR, que dan lugar a proteínas detectables pero no funcionales; o, 3. algunas lesiones pueden tener un defecto en genes MMR desconocidos, en genes no-MMR o afectados por mecanismos epigenéticos (533). También se ha observado ausencia de MSI en lesiones con débil positividad, que confirma hallazgos similares en otros tumores (535), lo que sugiere que niveles relativamente bajos de proteínas MMR pueden mantener lesiones estables genéticamente o que no hay correlación entre la expresión y función de MMR en lesiones melanocíticas.

Por otra parte, aunque los mecanismos subyacentes derivados de este patrón L-MSI son desconocidos algunos tumores con este fenotipo tienen peor pronóstico que su contrapartida MSS (536). Entre ellos se incluyen tumores como los carcinomas colorrectales y gástricos. Se ha comprobado que los tumores L-MSI implican vías patogénicas diferentes de los tumores H-MSI y MSS (537). Más aún, se ha demostrado que melanomas metastásicos con baja expresión de proteínas MMR son resistentes a la quimioterapia, probablemente relacionado con un incremento de los niveles de mutaciones de los genes que controlan la sensibilidad a las drogas (527,538,539).

7. Proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima

7.1. Cadherinas

Las cadherinas, glicoproteínas transmembrana calcio-dependientes (750-900 aa), son las mediadoras de la adhesión célula-célula de forma homotípica (unión entre células con fenotipos similares), y forman el complejo de adhesión transmembrana célula-célula más importante y abundante en tejidos epiteliales, conocido como: uniones adherentes (540,541). La familia de las cadherinas incluyen más de 20 tipos diferentes, de las cuales, las más estudiadas son la cadherina E (epitelial), la cadherina N (neural), la cadherina P (placentaria) y la cadherina LI (hepática-intestinal) (542). Las cadherinas clásicas comparten una estructura similar: poseen cinco dominios extracelulares a través de los cuáles interaccionan con las moléculas de cadherina adyacentes, dependientes de calcio, se integran en la membrana plasmática y se asocian al citoesqueleto de actina mediante las cateninas α y β (543). La cadherina E (también denominada uvomorulina), descrita a principios de la década de los '80 (544), es la cadherina mejor caracterizada y fue la primera en describirse. Su gen (CDH1), localizado en el cromosoma 16q, codifica para una proteína de unos 120 kDa que se expresa desde muy temprano en células embrionarias (545).

La propiedad de adhesión se adquiere por la agrupación en la superficie membranosa de cadherinas que incrementa de forma significativa la fuerza de adhesión (546), y está mediada por varios mecanismos interrelacionados (cateninas α y β , y p120) dependientes del calcio (547). Además, la interacción con el citoesqueleto celular, estabiliza e incrementa la fuerza de las adhesiones intercelulares (546), y a su vez favorece la agrupación de los dímeros moleculares en la membrana. Recientemente se ha observado un papel funcional en la formación, crecimiento y diferenciación de órganos, biológicamente ligado, por una parte a su capacidad de adhesión (548) y por otra, a su relación con la catenina β , que cuando no esta unida a la cadherina E ni a la catenina α puede translocarse al núcleo, unirse a factores de transcripción de la familia TCF e inducir la expresión de un amplio número de genes (549).

Los melanocitos normales se disponen a nivel de la capa basal epidérmica y contactan con los queratinocitos por medio de sus dendritas, existiendo un melanocito por cada 36-40 queratinocitos (unidad melánica epidérmica) o un melanocito por cada 5 células basales. La densidad de los melanocitos es variable dependiendo de la región anatómica (es más alta en la región genital) (550). El crecimiento de los melanocitos está controlado por los queratinocitos del entorno a través de la comunicación extracelular por factores de crecimiento paracrinos, comunicación intracelular a través de segundos mensajeros, y comunicación intercelular por uniones intercelulares (551). En condiciones normales se mantiene la homeostasis, que determina la quiescencia, proliferación, diferenciación o apoptosis de las células (552). La alteración en la regulación de la homeostasis puede alterar el equilibrio de la unidad melánica-epidérmica y desencadenar una proliferación continua e incontrolada de los melanocitos. No se conocen exactamente los mecanismos por los que sobreviene esta alteración de la

homeostasis. Sin embargo, las células del melanoma escapan de los mecanismos de control de los queratinocitos a través de tres mecanismos: 1. disminución de la expresión de los receptores implicados en la comunicación y en la adhesión a los queratinocitos (ej: cadherina E); 2. aumento de la expresión de los receptores y moléculas de señalización no expresados en los melanocitos normales, pero importantes en la interacción melanoma-melanoma y melanoma-fibroblastos (p.e. cadherina N, Mel-CAM (*melanoma cell adhesion molecule*)); 3. pérdida de los mecanismos de anclaje a la membrana basal (expresión alterada de la familia de las integrinas) (550). Estos cambios son semejantes a los que frecuentemente se dan en tumores epiteliales, en los que la progresión tumoral se acompaña de la pérdida de cadherina E, y sobre-expresión de cadherina N (553-556).

Nuestro estudio ha demostrado que, en melanocitos normales, la cadherina E representa la molécula de adhesión con los queratinocitos más importante, como ya se había observado en estudios previos (557-559). En nevus melanocíticos compuestos, la cadherina E presenta una expresión intensa-moderada en melanocitos juncutales que claramente disminuye a medida que las células progresan hacia la dermis. En nevus congénitos y adquiridos se observa una inmunoreactividad moderada de 45% y 31% respectivamente. Se observa expresión de cadherina E en algunos melanocitos en dermis papilar y disminución de su expresión hacia dermis profunda. En nevus de Spitz (84%; $pI/S < 0.05$) se observa positividad para cadherina E en nidos juncutales y también en la mayoría de los nidos dérmicos. Finalmente, en nevus displásicos se observa intensa positividad en melanocitos de la unión (100%; $pI/D = 0.000$). Los melanomas muestran inmunopositividad para cadherina E en el compartimiento intraepidérmico, lo que explica una positividad del 88% en melanomas radiales que disminuye hasta el 61% en melanomas verticales (valor p no ajustada: $pR/V = 0.044$). Su expresión disminuye en su progresión hacia la dermis, como sucede en nevus. Cuando persiste cierta positividad en melanomas nodulares, esta expresión se vuelve más débil y presenta un patrón heterogéneo (558).

Estos datos coinciden con estudios previos (558-560), que demuestran una pronunciada disminución de la expresión de cadherina-E en los melanocitos de la dermis tanto en nevus como en melanomas, más llamativa en nevus, donde dichos melanocitos son completamente negativos (558), mientras que en melanomas, ocasionalmente se observa retención focal de su expresión, incluso en zonas profundas (558). Aunque en la literatura la disminución de la expresión de cadherina-E ha sido frecuentemente atribuida al tipo citológico de las células névicas (tipo A: redondeadas o poligonales con moderado citoplasma; B: escaso citoplasma; C: morfología fusocelular) (559,560), recientemente, existe más tendencia a relacionarla con la localización de las células en dermis profunda. Además, en nevus de Spitz tanto los melanocitos epitelioides como los fusiformes pueden mostrar fuerte positividad frente a cadherina-E (558). Parece que la prolongada ausencia del estímulo paracrino de los queratinocitos vecinos puede contribuir a la pérdida de la expresión de cadherina-E en los

melanocitos dérmicos. Aunque se ha demostrado que los nevocitos dérmicos producen bFGF (que es el factor de crecimiento de los melanocitos derivado de los queratinocitos más prominente) de forma autocrina, favoreciendo su supervivencia en la dermis, sin embargo, la ausencia de otros factores puede ser importante (558). Además, se ha visto que los colágenos I y III pueden regular negativamente la expresión de cadherina-E en el cáncer de páncreas (561), lo que podría favorecer la pérdida de su expresión también en melanocitos dérmicos. Sin embargo, el mantenimiento de la expresión de cadherina-E en nevus de Spitz, incluso en células profundamente localizadas en la dermis, sugiere que existen mecanismos desconocidos que les confieren cierta autonomía. También se ha demostrado positividad para cadherina-E en nevus azules (558).

Por otra parte, pese a que ha existido cierta controversia en relación con la expresión de cadherina-E en melanomas (puesto que existen estudios que demuestran positividad fuerte y estable de cadherina E en melanomas tanto en fase de crecimiento radial y vertical) (559), parece que la mayoría de los estudios más recientes (558,560), coinciden en que se produce una disminución de la expresión de cadherina E en el componente profundo. Los hallazgos de una tinción heterogénea de su expresión en algunos melanomas pueden representar diferencias clonales en la expresión antigénica (558). Es extensamente reconocido que la transformación maligna se caracteriza por importantes cambios en la organización del citoesqueleto, disminución de la adhesividad y alteración de las cascadas de señalización mediadas por la adhesión, y que la alteración de la adhesión normal puede favorecer la proliferación y la migración de dichas células facilitando la invasión tumoral y las metástasis. Varios estudios en tumores epiteliales indican que esta alteración puede ser el resultado de una disminución en la expresión de la cadherina E que impide el ensamblaje de las uniones adherentes (562-567). Las mutaciones en el gen *CDH1* (gen que produce la cadherina E), compromete la función de la cadherina E en cáncer gástrico y carcinoma lobulillar de mama (562). Se ha observado también la metilación del ADN en el promotor de *CDH1*, que frecuentemente produce una disminución de la expresión de genes supresores en células cancerosas en carcinoma de mama, adenocarcinoma de próstata y carcinoma hepatocelular (563). También puede resultar una expresión aberrante de la proteína a partir de una transcripción que acalle el *CDH1* (564). Además, se han observado mutaciones a nivel de las cateninas en varios tipos de tumores que resultan en una alteración de la adhesión celular: tanto la delección de la catenina α (565), como de la catenina β , como de los factores que regulan los niveles citosólicos de la catenina β (566). También se ha observado en células malignas una activación de la cascada de señalización mediada por catenina β (567). Sin embargo, el significado de la pérdida de la expresión de cadherina E en la progresión de los tumores melanocíticos queda aún por aclarar. Aunque se ha demostrado (568) que la reconstitución de cADN-cadherina E en los melanomas carentes, pobremente diferenciados, da lugar a la reducción del potencial maligno en las células del melanoma, y a una mayor supervivencia en

el grupo de pacientes con melanomas que mantienen la expresión de cadherina-E (569), la pérdida de cadherina E también se produce en lesiones benignas, por lo que no es una característica específica de malignidad.

Por otra parte, se ha demostrado que la cadherina N, contrariamente a la cadherina E, promueve la motilidad y la invasión tumoral, favoreciendo la activación del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR), por medio de sus dominios extracelulares que lo estabilizan, y sostiene la señal extracelular regulada por la activación quinasa ERK (570); y, en segundo lugar, la cadherina N también promueve las interacciones entre el tumor y los tejidos del huésped que presentan cadherina N como el estroma (571) y el endotelio vascular (572) que puede favorecer el crecimiento y la diseminación metastásica. Así, la expresión de cadherina-N no se ha detectado en nevus congénitos, ni en nevus intradérmicos/compuestos, ni en nevus displásicos. Curiosamente, 5 de 24 nevus de Spitz (21%) muestran inmunopositividad para cadherina-N. Y, en melanomas en fase de crecimiento vertical, se observa positividad heterogénea en el 28% ($p/V < 0.05$). Estos resultados coinciden también con estudios previos (239,558,559,573). Como en otros tumores malignos (557,568), en melanomas la expresión de cadherina-N parece inducir la motilidad, la invasión, la capacidad metastásica, y un peor pronóstico (239,573). Sin embargo la expresión de cadherina-N en nevus de Spitz, sugiere que los mecanismos subyacentes de tales efectos no están completamente aclarados (558).

7.2. SPARC (osteonectina/BM-40)

SPARC (*“secreted protein acidic and rich in cysteine”*), también denominada onectina, BM-40 y proteína 43K, es una glicoproteína extracelular asociada a la matriz ósea, que se identificó por primera vez como un constituyente mayor no colagenoso del hueso bovino (574), y se encuentra en el citoplasma de diversos tipos de células, entre las que se incluyen los osteoblastos y los fibroblastos. La onectina pertenece a un grupo de factores asociados a la matriz que intervienen en las interacciones célula-matriz pero no juegan un papel estructural (575).

Numerosos estudios han confirmado el incremento de la expresión de SPARC en una gran variedad de tumores malignos (576), entre los que destacan los de origen mesenquimal: osteosarcoma, sarcoma pleomórfico, tumores de células gigantes del hueso, fibrohistiocitoma maligno, angiosarcoma, leiomioma y hemangioendotelio (576). La expresión de SPARC en tumores epiteliales es más variable, y se relaciona con la progresión tumoral en el cáncer de mama y de colon (577,578), mientras que otros carcinomas parecen ser completamente negativos (576). Recientemente, se ha demostrado su expresión en el glioblastoma (579), en la progresión de los melanomas (580) y en la invasión de los meningiomas (581).

Nuestro estudio ha demostrado que SPARC/osteonectina no se expresa en nevus congénitos (0%) ni en nevus intradérmicos (0%), mientras que existe una alta positividad en nevus de Spitz (96%; $p/S < 0.05$) y en nevus displásicos (91%; $p/D < 0.05$). En melanomas en fase de crecimiento vertical se observó inmunoreactividad hasta en el 43% de los casos ($p/V < 0.05$). Sólo existe un estudio previo que examine la expresión de SPARC en lesiones melanocíticas benignas y malignas. El grupo de Podhajcer (580) demuestra que SPARC se expresa predominantemente en el citoplasma de las células de melanomas, y en las células endoteliales y fibroblastos. Nuestros resultados difieren parcialmente de los obtenidos previamente por estos investigadores (580), ya que sus datos demuestran expresión de SPARC en todos los melanomas metastáticos (29/29) y en todos los melanomas primarios estudiados (7/7). Esta diferencia en melanomas primarios puede deberse a diferencias de sensibilidad entre los anticuerpos utilizados en cada caso, al punto de corte, al número de casos de la serie, ya que en el estudio de Podhajcer *et al.* (580) no se define el subgrupo de melanomas a estudio (tipo, espesor, fase de crecimiento), lo que hace difícil la comparación. Sin embargo, como en nuestro estudio, observan positividad moderada-intensa en la mayoría de nevus displásicos (13/14), y únicamente en 4 de 25 casos de nevus benignos comunes, con una tinción débil. No se observó tinción en melanocitos normales. Estos resultados sugieren que la expresión de SPARC se correlaciona con la progresión neoplásica en el melanoma (580).

SPARC puede ser el producto tanto de las células tumorales, como de las células del huésped (estroma y células inflamatorias). Varios estudios han mostrado que la sobreexpresión de SPARC en cáncer de mama (582) y en cáncer colorrectal (583) se observa en los fibroblastos del entorno y sugieren que son las células tumorales las que originan señales que regulan los niveles de expresión de SPARC en los fibroblastos, que a su vez juega un papel en la progresión tumoral, mientras que en melanomas son las células tumorales por sí mismas las que expresan altos niveles de SPARC. Además estos niveles no están regulados por ningún factor de origen fibroblástico como TGF- β . Estos datos indican que los altos niveles de expresión constitutivos de SPARC pueden conceder a las células del melanoma la capacidad de regular por ellas mismas el efecto sobre la matriz extracelular necesario para la progresión tumoral (580). La cuestión de si el SPARC producido en las células malignas por sí mismas o en los fibroblastos del entorno produce cambios similares se sigue investigando (580).

Varias de las funciones de SPARC pueden favorecer la progresión tumoral en las lesiones melanocíticas. En contra de la función que ejercen la mayoría de las proteínas asociadas a la TEM, SPARC (así como otras glicoproteínas secretadas como trombospondina, y tenascina), no está implicada en el soporte celular, sino que favorece cambios en la morfología celular que contribuyen a la liberación de dichas células de la MEC (584), alterando el número y la distribución de los lugares de adhesión celulares y favoreciendo la reorganización de los elementos del citoesqueleto. Por otra parte, varios autores han sugerido también que SPARC está implicada directa o indirectamente en la inhibición de la proliferación

en algunas células, a través del ciclo celular. Se ha demostrado experimentalmente que la primera región catiónica del dominio II (aa 54-73) detiene el ciclo en mitad de la fase-G1 (585); sin embargo, la segunda secuencia catiónica (aa 113-130) estimula la proliferación bajo condiciones similares (586). Resulta de especial interés, que la actividad de la segunda secuencia catiónica está enmascarada cuando la proteína está intacta. El papel de SPARC en la inhibición de la proliferación de algunas células sugiere su posible implicación en la diferenciación o senescencia celular, aunque este punto no ha sido investigado en profundidad por el momento (585,586). Recientemente, se ha observado también que SPARC juega un papel importante en la regulación de la actividad de, al menos, varios factores de crecimiento, y que podría influir en la regulación de la angiogénesis. Directamente, a través de su estructura proteica, o indirectamente mediante la regulación de la actividad de algunos factores de crecimiento (574).

Así, el contexto tumoral en el que se expresa la glicoproteína SPARC es crucial para entender su actividad biológica. En el melanoma, SPARC es capaz de inducir la expresión de metaloproteinasas, derivadas de los fibroblastos e implicadas en la degradación de las membranas basales y del tejido conectivo intersticial de alrededor de las células tumorales, favoreciendo la capacidad invasiva del tumor. También modula la liberación de laminina y fibronectina, sugiriendo un importante papel de dichas enzimas en el reensamblaje de la matriz, la invasión local y a distancia (580,587). Si el tumor se asocia con metaloproteinasas específicas (que actúan sobre L197-L198) SPARC se unirá al colágeno con mayor afinidad y se localizará en la interfase entre las células endoteliales y la membrana basal (que está parcialmente constituida por colágeno de tipo IV), así, disminuye la adhesividad e incrementa la permeabilidad vascular.

Más aún, varios estudios han demostrado (580,587) que SPARC puede sufrir una glicosilación post-translacional y un clivaje extracelular que parece ser específico para las células del melanoma, y esto le confiere una capacidad de unión a componentes específicos de la matriz, diferentes de otros tumores, lo que podría tener una importante implicación en la progresión tumoral del melanoma. Péptidos correspondientes a diferentes dominios de la proteína han demostrado efectos específicos sobre la proliferación, la regulación en la morfología celular y la capacidad de unión al colágeno, que a veces quedan enmascaradas en la proteína completa. Así, aunque ha quedado demostrado que SPARC es capaz de inhibir la proliferación endotelial, el clivaje de la secuencia catiónica de SPARC en el dominio II es capaz de estimular la proliferación endotelial y de fibroblastos y la angiogénesis; y los dominios III y IV son responsables de la unión de SPARC al colágeno IV (580). Todo esto sugiere fuertemente que la osteonectina puede jugar un papel clave en el proceso de invasión tumoral en el melanoma.

Finalmente, se ha demostrado que la expresión de osteonectina está relacionada con el pronóstico en melanomas “finos” ($\leq 0.75\text{mm}$), así, el incremento en la expresión de

SPARC se correlaciona con mayor índice de metástasis ($p=0.005$), y menor supervivencia ($p=0.03$) (587,588). Recientemente (588) se ha sugerido que los niveles séricos de SPARC sólo, o junto con otros dos marcadores (glipican-3, y 5-S-cisteinildopa) pueden ser considerados potenciales marcadores pronósticos en melanomas, especialmente en estadios tempranos de la enfermedad. También existen estudios que han demostrado que la inhibición de SPARC en las células del melanoma suprime su capacidad tumoral, proporcionando una potencial diana terapéutica para el gen SPARC (589).

Por otra parte, cabe destacar que no existen en la literatura trabajos sobre nevus de Spitz que pudieran explicar los altos niveles de expresión de la proteína en nevus de Spitz y nevus displásicos observados por nuestro grupo, y aunque son necesarios estudios futuros en este sentido para aclarar su función, sugerimos que SPARC podría estar implicada en la regulación de la proliferación y la senescencia celular.

7.3. Osteopontina

La osteopontina (OPN) pertenece a una familia de proteínas cuyos genes se localizan en una misma región situada en el cromosoma 4, la familia SIBLING ("*small integrin binding ligand N-linked glycoproteins*"). Todos los miembros de la familia SIBLING comparten su expresión en el hueso y el diente, y su unión a, al menos, un receptor de la familia de las integrinas (590,591). Es una sialoproteína de estructura compleja, de aproximadamente 60 kDa y con múltiples isoformas, sobretudo post-transduccionales por fosforilación y glicosilación variables, que a su vez explican los diferentes pesos moleculares aparentes y los distintos nombres que se le han atribuido (592). Existen formas intracelulares y extracelulares, en la matriz celular del hueso y en algunos fluidos (leche, orina, bilis) (593). Además, existen formas libres y conjugadas (590-591).

Numerosos estudios han demostrado un incremento de los niveles de ARNm y proteína de OPN en tumores de pulmón (594), mama (595), esófago (596), estómago (597), próstata (598), y gliomas (599). La expresión de la OPN ha sido identificada por inmunohistoquímica, específicamente localizada en los macrófagos en algunos tumores, y en macrófagos y células tumorales en otros (600). Así, estudios recientes en melanomas, han demostrado que la osteopontina es uno de los genes más intensamente sobreexpresados en metástasis (239,601).

Nuestro estudio no muestra expresión de OPN en nevus congénitos (0%) y sólo discreta en nevus intradérmicos (14%) y nevus displásicos (13%). Se observa un incremento en nevus de Spitz (67%; $p/I/S<0.05$), y en melanomas en fase de crecimiento vertical (71%; $p/I/V<0.05$). Hasta el momento, existe un único estudio que pretende determinar la importancia clínica de la osteopontina en diferentes tipos de lesiones melanocíticas benignas y malignas, investigando sus niveles de expresión a nivel del ARNm y proteico (PCR e inmunohistoquímica) (601). Los resultados obtenidos son comparables a los nuestros, ya que

demuestran una tinción ausente o débil en nevus comunes, en nevus displásicos, y en melanomas in situ; y demuestran altos niveles de expresión hasta en el 72% de los melanomas primarios invasivos, con una diferencia significativa en comparación con lesiones melanocíticas en fases precoces ($\chi^2=28.9$; $p<0.000001$) (601).

En los últimos años, muchos estudios han tratado de esclarecer el papel de la OPN en la progresión tumoral (602). La OPN es capaz de unirse a una variedad de integrinas de superficie que le confieren la capacidad de adhesión, migración, proliferación y supervivencia (603). La OPN puede unirse también a otros receptores como el CD44 (604), que también facilita la progresión y la migración tumoral, mediado bien directamente por las integrinas (605) o a través de las vías de señalización de los receptores de los factores de crecimiento (606). La interacción de la OPN con las vías de señalización de los receptores de los factores de crecimiento puede afectar a la adhesión y la invasión de las células tumorales, incrementando la afección de las integrinas por sus ligandos específicos y su expresión (607,608). La inducción de proteasas celulares por la OPN facilita también la migración y la invasión celular, degradando los componentes de la MEC, activando otras proteasas, o induciendo cascadas de señalización intracelulares (609,610). La OPN también está implicada en la angiogénesis a través de su unión con la integrina $\alpha v \beta 3$ que desarrolla un papel importante en la supervivencia y diferenciación de las células vasculares (611) y ambas están implicadas en la reparación y regeneración vascular (612). Además, la OPN es capaz de proteger a las células endoteliales de la apoptosis, y por tanto promueve su supervivencia a través del factor NF- κ B (613). Finalmente, la OPN juega un papel importante en la supervivencia de varios tipos celulares a través de la interacción con sistemas defensivos del huésped. Juega un papel en la defensa de las células tumorales frente al sistema inmune y promueve la progresión tumoral a través del óxido nítrico (ON) (614). Sin embargo, las interacciones de la OPN con el sistema inmune pueden tener efectos contradictorios ya que la secreción de OPN (con capacidad quimiotáctica para muchos tipos celulares, incluyendo los macrófagos) atrae células inflamatorias del huésped, lo que facilita la destrucción de las células tumorales (615), también puede inactivar la vía del complemento uniéndose y activando al factor H (que inhibe la vía de lisis celular por el complemento) (616). La demostración inmunohistoquímica de la expresión aberrante de OPN en fases precoces de la progresión del melanoma (en el citoplasma, acompañadas o no de expresión en los macrófagos acompañantes) se relaciona con la adquisición de su capacidad de invasión. Varios estudios han observado que la OPN induce la motilidad celular, el crecimiento tumoral y la activación de la metaloproteinasas a través de la vía de señalización quinasa-PI-3/AKT (mediado por el factor nuclear κ B) (617,618).

La expresión de la OPN en algunos tumores ha desencadenado también el interés en su uso potencial como marcador de agresividad y del mal pronóstico (en pulmón (594), mama (595), gástrico (597) y gliomas (599)). De hecho, se ha observado que los niveles séricos de OPN están incrementados entre 4 y 10 veces en una variedad de carcinomas humanos diseminados, que incluyen los carcinomas de mama, pulmón y próstata (619).

Recientemente, en estudios centrados en largas series de melanomas primarios

(239,620), se ha observado que la expresión de OPN se asocia de forma significativa ($p<0.05$) con el incremento del espesor de Breslow, el nivel de Clark y el índice mitótico (620), que representan factores pronósticos universalmente conocidos en el melanoma. Estos mismos estudios demuestran que la expresión OPN se asocia también con una disminución del periodo libre de enfermedad y de la supervivencia específica por el tumor (239,620). En el análisis multivariante, la expresión de OPN, se revela como un factor pronóstico independiente para la supervivencia, con mayor impacto que el espesor tumoral (620), lo que sugiere su potencial importancia clínica en la identificación de candidatos al mapeo linfático y a la biopsia de ganglio centinela (620).

Finalmente, el grupo de Zhou (601), ha demostrado que el uso de ARNsi (*"small interference"*) OPN en líneas celulares de melanoma transfectadas disminuye de forma significativa el número de células tumorales. El bloqueo específico del ARNm de la OPN fue confirmado usando RT-PCR cuantitativa (601). Aunque por el momento no se han llevado a cabo nuevos estudios, la OPN ofrece una nueva terapia génica potencial para el melanoma, como se está empezando a enfocar en otros tumores como el cáncer gástrico (621).

Los nevus de Spitz, con características morfológicas y biológicas particulares, expresan altos niveles de osteopontina (67%; $p/S=0.000$) en nuestro estudio. Estos resultados no coinciden con el único estudio previo que existe en el momento actual (622), que muestra una expresión ligera. Esta diferencia podría explicarse por el anticuerpo utilizado, policlonal en nuestro estudio, y monoclonal en el estudio previo; la gradación de la tinción y los puntos de corte, diferentes en ambos casos; y la subjetividad inherente al estudio inmunohistoquímico. El grupo de Winfield (622), sin embargo, pone de manifiesto que la validación del papel de la OPN en el nevus de Spitz requiere nuevos estudios. Todo apunta a que la OPN juega un papel en la transición entre las células melanocíticas y el estroma, también en el nevus de Spitz.

7.4. PKC (*protein kinase C*)

La familia de proteínas quinasas C, parte integral de la maquinaria de señalización de la célula, está representada por múltiples (más de 10) isoenzimas que difieren en su estructura y su expresión en diferentes tejidos, en su modo de activación y en su sustrato específico (623). Se pueden clasificar en tres subfamilias atendiendo a las diferencias estructurales que dictan su capacidad para interactuar con los cofactores Ca^{2+} y diacilglicerol (624): cPKC (clásica o convencional: Ca^{2+} -dependiente) comprende las isoformas α , β I, β II, y γ ; nPKC (nueva: Ca^{2+} independiente) comprende las isoformas δ , ϵ , η , y θ ; y la subfamilia aPKC (atípica: no tiene capacidad de unirse a Ca^{2+} ni a diacilglicerol) que comprende las isoformas ζ , y λ /I. Aunque, PKC α es la más ubicua de las isoformas, la determinación de sus funciones biológicas específicas está dificultada por la ubicuidad de la expresión de la mayoría de las isoformas PKC en las células que contribuyen a la redundancia funcional entre los distintos miembros de las subfamilias (625,626). Sin embargo, investigaciones con nuevas tecnologías han implicado a

PKC α en varias funciones biológicas como la proliferación, diferenciación, control del ciclo celular, apoptosis/supervivencia celular, y adhesión celular (623,626).

PKC α está regulada e interacciona funcionalmente con una serie de proto-oncogenes como Ras, Raf-1 y Bcl-10 (627-630). No resulta sorprendente que los procesos celulares que promueven la transformación maligna, como la proliferación incontrolada, la pérdida del control del ciclo celular, y las metástasis impliquen la alteración de isoenzimas específicas PKC (631). En particular, PKC α se ha relacionado con algunos tipos de tumores (pe. cáncer de mama (631)), y ha surgido como una posible diana para el tratamiento de los mismos (632). Sin embargo, PKC α puede tener efectos opuestos en cuanto a la regulación del ciclo celular y la apoptosis según el sistema celular estudiado (625).

La comparación de perfil de expresión génica entre diferentes fases de progresión del melanoma, identifica al gen correspondiente a la proteína-quinasa C alfa como uno de los más amplificados (x 3.207) (239), lo que sugiere un importante papel de la proteína PKC α en la progresión del melanoma.

En nuestro estudio demostramos una alta positividad en nevus congénitos (90%), nevus intradérmicos (100%), y nevus de Spitz (96%), y una disminución de su expresión en nevus displásicos (42%; $p/D < 0.05$). En relación con los melanomas en fase de crecimiento vertical (48%) se observa una disminución respecto a nevus comunes ($p/V = 0.000$) y discreto aumento respecto a nevus displásicos (diferencia no significativa). En la literatura, existen pocos estudios centrados en la expresión proteica de PKC α en lesiones melanocíticas benignas y melanomas. Hasta el momento, únicamente el grupo de Oka *et al.* (633,634) estudian una serie de 21 melanomas primarios (14 casos melanomas lentiginosos acrales; 7 casos de melanomas de extensión superficial) y 4 melanomas metastásicos (2 de los MLA, y 2 de MES), observando negatividad en la expresión de PKC α en la totalidad de los MLA de <1.5 mm de espesor tumoral, con un notable incremento (significativo) de su expresión en MLA en todos los tumores >4 mm de espesor y metastásicos que resultaron intensamente positivos. En cambio, estos autores demostraron una positividad constante en todos los estadios en melanomas de extensión superficial. Estos datos sugieren un papel potencialmente diferente de estas enzimas dependiendo del tipo de melanoma, lo que refuerza la hipótesis de la heterogeneidad genómica (224). Por otra parte, el incremento en la expresión de PKC α en melanomas en fase de crecimiento vertical frente a la fase de crecimiento radial en el MLA, sugiere que esta proteína juega un papel importante en la progresión tumoral en fases más tardías en este subtipo de melanoma. Mientras que en el MES parece que no está implicada en la progresión, y sin embargo puede contribuir al fenotipo maligno de estos melanomas. En nuestro estudio no hemos dividido la serie de melanomas en subtipos histológicos, sin embargo parece existir una tendencia al aumento de la expresión de la proteína en melanomas en fase de crecimiento vertical frente a nevus displásicos (no significativa). Varias cuestiones limitan la comparación entre ambos estudios: en primer lugar, el grupo de Oka *et al.* (633) no define un punto de corte concreto, sino que mide la intensidad de tinción de forma semicuantitativa (0: negativo, +/-:

débil, +: positivo; ++: positividad fuerte) y consideran positiva cualquier intensidad de tinción (nosotros establecemos el punto de corte en $\geq 50\%$); en segundo lugar estudian una serie relativamente corta de melanomas (21 melanomas); además, subdividen la serie en tipos histológicos; por otra parte, nuestras propias limitaciones de tejido, nos impiden realizar el estudio sobre melanomas radiales. Sin embargo, los resultados de ambos estudios parecen sugerir que PKC α participa en la progresión de la fase de crecimiento radial a la vertical en algunos tipos de melanomas.

Por otra parte, Oka *et al.* han estudiado también los niveles de PKC α en lesiones melanocíticas benignas por inmunoblot (634) en melanocitos en cultivo, detectando en los 4 casos de lesiones névicas, y mediante inmunohistoquímica (634) positividad en la mayoría de las células. Estos datos coinciden con nuestros resultados. Además, este mismo grupo (635), estudia la expresión de ARNm y de proteína PKC α en melanocitos humanos en cultivo, y demuestran que PKC α se expresa fuertemente en melanocitos humanos normales en cultivo. Es más, estudios experimentales han demostrado que el 12-O-tetradecanoilforbil-13-acetato (TPA), un potente estimulador de PKC (636), afecta de forma importante al crecimiento y a la diferenciación de las células melanocíticas humanas (635), afectando tanto los niveles de proteína como la distribución intracelular de las isoformas de PKC (635). Los melanocitos humanos normales crecen en un medio de cultivo que contenga TPA, y la deprivación de TPA induce la apoptosis de los mismos (636), lo que sugiere un importante papel de PKC en el crecimiento y la supervivencia de los melanocitos humanos normales a través de la vía MAPK (637).

En contraste, el crecimiento tumoral de la mayoría de los melanomas está inhibido por TPA (638). TPA bloquea la proliferación de las células evitando la progresión del ciclo celular en G1/S y en G2/M en líneas celulares de melanoma, mediante la activación de PKC y no disminuyendo sus niveles (638). Recientemente se ha demostrado que el tratamiento de las células de melanoma A-375 con un inhibidor selectivo de cPKC (Ro-31-8220), así como con un oligonucleótido "antisentido" de la isoforma α , aumenta la síntesis de ADN, mientras que la microinyección de proteína recombinante de PKC α en células de melanoma (SKMel-28), disminuye su proliferación (639). El sistema celular involucrado determina la habilidad de PKC α para actuar como estimulador o como inhibidor del ciclo celular. PKC α también puede jugar un papel inhibitorio durante la regulación del ciclo celular, en células intestinales (640) o células tumorales del páncreas (641), en las que los efectos de la señalización mediada por PKC α conducen a las células a abandonar el ciclo celular.

Así, aunque ha quedado ampliamente demostrado que PKC α suprime el crecimiento de las células del melanoma, varios estudios han observado que esta proteína está implicada en la motilidad y la capacidad metastásica de las células del melanoma (635). Por una parte, se ha demostrado que el factor de motilidad autocrino (que es una citoquina que regula la migración de las células tumorales), induce la translocación de PKC α hacia las fibras de estrés y la actina del citoesqueleto de la células del melanoma (línea celular B16a), lo que sugiere su papel en la motilidad de dichas células (642). Además, los niveles de expresión de PKC α se han

correlacionado con la capacidad invasiva de las células del melanoma en 6 clones diferentes de la línea celular de melanoma humano 665/2, que además muestran una alteración en el perfil de las integrinas y del grado de diferenciación (643). Se ha propuesto que los mecanismos moleculares implicados en el incremento de la motilidad y de la capacidad invasiva son la translocación de PKC α a la membrana plasmática, induciendo la adhesión de las células a las proteínas de la matriz extracelular, y la sobreexpresión de integrinas en la superficie (644). El incremento en la actividad de PKC α induce también alteraciones morfológicas (631), por su asociación con la integrina- β 1, responsable del reordenamiento del citoesqueleto dependiente de actina (645). Por otra parte, la PKC α se puede asociar también a la fascina (proteína de unión a la actina que participa en la formación de microfilamentos) (646). Más aún, PKC α regula la vía de señalización Wnt, que le permite también incrementar la motilidad y la capacidad invasiva de las células (647). La sobreexpresión de Wnt5a produce un incremento de la invasión celular, y la activación de las isoformas cPKC, presumiblemente la isoforma α en la células de melanoma B16. El bloqueo de esta vía, mediante anticuerpos frente al receptor Frizzled-5 (del ligando Wnt5a) inhibe la actividad PKC y la invasión celular (647).

Varios estudios experimentales (648), también han demostrado una correlación entre la actividad metastásica y el nivel de expresión de PKC en líneas celulares de melanoma B16, y que el tratamiento con TPA de dichas células induce la activación y la translocación de PKC hacia la membrana plasmática e incrementa la capacidad de metástasis. También, el tratamiento de células de melanoma C8161 (649) con un oligonucleótido inhibidor específico de la isoforma α de PKC, induce una reducción de hasta el 70% de su ARNm en dichas células, y es capaz de suprimir las metástasis hasta en un 77% en ratones. Así, existe un incremento en la expresión de PKC α con la progresión tumoral y su inmunotinción es mayor en tumores metastásicos que en lesiones primarias en muestras humanas de melanomas (633,650). En un estudio reciente, Alonso *et al.* (239) demostraron, en un análisis multivariante en relación al periodo de supervivencia libre de enfermedad, que la proteína PKC α era un factor pronóstico independiente del índice de Breslow.

En resumen, estos datos sugieren que es poco probable que PKC α juegue un papel directo en la transformación maligna de los melanocitos, sin embargo la activación de PKC α se asocia con un incremento en el potencial invasivo y metastático de las células del melanoma. Nuevos estudios sobre series más largas de melanomas primarios en fases de crecimiento radial y vertical y melanomas metastásicos humanos, podrían validar estos datos. Por otra parte, varios estudios sugieren también que PKC α podría representar una diana terapéutica, ya que actúa sobre una vía específica, y las células normales suelen tener varias vías redundantes, y pueden compensar una inhibición súbita de una de ellas, y estos inhibidores parecen ser menos tóxicos “in vivo” que los agentes de la quimioterapia clásica (650).

7.5. WT1

WT1, inicialmente identificado como un gen localizado en el cromosoma 11p13 (651,652), demostró estar implicado en la predisposición al desarrollo de tumores de Wilms en pacientes pediátricos por la inactivación de su función por mutaciones somáticas (653) o pérdida de la heterocigosidad (654). El WT1, uno de los primeros genes supresores de tumores en ser clonados (651), codifica una proteína con las características estructurales de los factores de transcripción que reconocen secuencias específicas de ADN en la región reguladora de los genes (655). En la vida embrionaria, WT1 juega un importante papel en el desarrollo del tracto genito-urinario, bazo y estructuras mesoteliales (656,657). En los tejidos adultos normales, se expresa en el mesotelio, podocitos glomerulares, células mesangiales del riñón, células hematopoyéticas CD34+, células de Sertoli, células estromales, superficie epitelial y células de la granulosa del ovario, miometrio y células estromales del útero (655).

En los últimos años, la expresión de WT1 se ha asociado a tumores adultos de tejidos que normalmente no expresan WT-1: leucemias (658), carcinoma colorrectal (659), de mama (660), de pulmón (661), tumor desmoide (662) y tumores de SNC (663). Estos estudios demuestran además una sobreexpresión de WT1 mediante RT-PCR, y en el estudio del gen de WT1 mediante secuenciación directa de ADN, no se observan mutaciones en ninguno de los 10 exones del gen. Posteriormente se ha demostrado que oligómeros “anti-sentido” WT1 producen la inhibición del crecimiento de las células que expresan WT1 (658), y una correlación entre los niveles elevados de WT1 y un peor pronóstico en algunos tipos de tumores (658,664). Todos estos datos sugieren un probable papel oncogénico más que supresor de WT-1 en el desarrollo de estos tumores.

En relación con las lesiones melanocíticas, nuestro estudio demuestra mayor expresión de WT1 en nevus (51.4%) que en melanomas (39.6%). Todos los casos positivos mostraron una tinción citoplásmica en las células tumorales, sin tinción nuclear. Entre las lesiones benignas, los nevus melanocíticos intradérmicos y nevus de Spitz mostraron positividad hasta en el 69% y 63% de los casos respectivamente, la mayor intensidad de tinción se observó en dermis profunda, en las zonas “neurotizadas”. Sin embargo, en nevus congénitos, incluso en las células névicas más profundas, se observó una positividad de sólo el 10% ($pC/I < 0.05$). En nevus displásicos, se identificó expresión de WT1 en el 29% ($p/D < 0.05$) de los casos. En melanomas se observó mayor expresión en las lesiones en fase de crecimiento vertical (47%), que en aquellas en fase de crecimiento radial (18%).

Por el momento, únicamente dos estudios se han centrado en la expresión de WT1 en nevus y melanomas (665,666) y observan una menor expresión de WT1 en nevus (29.6% y 28.6% respectivamente) que en melanomas (83.7% y 89.2% respectivamente). Wilsher *et al.* (666) demostraron una alta expresión de WT1 en nevus de Spitz (83%), menor en nevus displásicos (35%), y negatividad en nevus comunes; así como incremento de la expresión en melanomas primarios (87.5%), sobretodo en melanomas desmoplásicos (100%) y en

melanomas metastásicos (90%). En este estudio (666), la expresión para WT-1 se consideró positiva si se observaba tinción débil, moderada o fuerte, nuclear, citoplásmica o membranosa. Perry *et al.* (665) obtuvieron resultados similares, en una serie más reducida de lesiones. De acuerdo con estos estudios previos (665,666), ninguno de nuestros casos mostró tinción nuclear. Por otra parte, nuestro estudio demuestra sobreexpresión de WT1 en los procesos fibrilares “neurotizados” de nevus comunes, zonas más profundas de nevus de Spitz y en estadios avanzados de infiltración en melanomas, lo que sugiere que esta proteína juega un papel en la diferenciación y dediferenciación de las células melanocíticas. Este fenómeno dual ha sido previamente descrito en situaciones normales, aunque el mecanismo no se ha dilucidado completamente. Es ampliamente reconocido que WT1 está implicado en la transición epitelio-mesénquima durante el proceso de formación de la nefronas, induciendo la salida de las células del ciclo celular y estimulando la diferenciación de las mismas (652). Sin embargo, lo contrario se ha observado en otros órganos. En el desarrollo del miocardio, WT1 participa en la proliferación de las células endoteliales progenitoras que surgen del epicardio, sugiriendo que WT1 induce el mantenimiento del estado indiferenciado en estas células (667). Además, aunque no se sabe si WT1 se expresa durante el desarrollo de los melanocitos, recientemente se ha observado que WT1 participa en diferentes fases en el desarrollo de la retina y en el SNC (668). Estos efectos aparentemente contradictorios de WT1 en la inducción vs. inhibición de la diferenciación y su efecto bidireccional en el control de la transición epitelio-mesénquima dependiente del contexto, podrían explicar en parte que WT1 pueda actuar como gen supresor de tumores en algunos tejidos y potencial oncogén en otros (668). Estos datos sugieren que esto es lo que sucede en nevus y en melanomas respectivamente, aunque serán necesarios estudios más profundos para establecer el potencial oncogénico de WT1 en el melanoma.

Por otra parte, estudios recientes de nuestro grupo, han demostrado también que existe una correlación significativa entre la expresión de WT1 y la fase de crecimiento vertical, con los niveles altos de Clark (niveles IV y V) y con mayor espesor tumoral (>1 mm) ($p<0.05$), lo que sugiere la utilidad de WT1 como marcador de la progresión tumoral en fases tardías en el melanoma (en prensa). Más aún, en este mismo estudio demostramos que los casos de melanomas WT-1 positivos muestran menor supervivencia (5 años) y tiempo libre de enfermedad que los casos negativos, siendo esta relación estadísticamente significativa.

Finalmente, se ha observado que la utilización de oligonucleótidos WT1 antisentido en líneas celulares de leucemia mieloide inhiben la proliferación e inducen la apoptosis (669). Actualmente, se están llevando a cabo ensayos clínicos con vacunas anti-WT1 que están resultando efectivas en algunos tipos de tumores (670), por lo que más estudios serán necesarios para valorar el potencial real de WT1 como inmunoterapia en melanomas.

8. Otras proteínas

8.1. HLA

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), o complejo de antígenos leucocíticos humanos (HLA), es una región de 4 megabases (Mb) situada en el cromosoma 6 (6p21.3) que contiene gran cantidad de genes. Los más conocidos son los HLA de las clases I y II. Sus productos son glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular, con estructuras y funciones inmunológicas distintas (671). Mientras que moléculas de clase I se encuentran presentes en la mayoría de las células nucleares del organismo, aunque no en todas, la expresión de las moléculas de clase II se encuentra fundamentalmente restringida a macrófagos, monocitos, linfocitos B y cuando están activados también a linfocitos T y NK. Igualmente se encuentran expresados en alta densidad en otras células que actúan como presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas del bazo, células de Langerhans o células endoteliales. También se han identificado en progenitores hematopoyéticos, células leucémicas y células de diferentes tipos de tumores. Esta distribución diferencial de las moléculas de histocompatibilidad de clase I y II se encuentra directamente relacionada con la diferente función de cada tipo de molécula.

En el desarrollo de las neoplasias, como resultado de las múltiples alteraciones genéticas, las células tumorales frecuentemente expresan nuevos antígenos que son presentados mediante las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (672). Así, la escasa eficacia de la quimioterapia en el tratamiento del melanoma, ha centrado la atención de muchos investigadores en la inmunoterapia. Sin embargo, estos tumores adquieren frecuentemente la capacidad de escapar al sistema inmune mediante mecanismos no del todo dilucidados (673). A principios del siglo pasado, *Ehrlich* sugirió el desarrollo de una respuesta inmune frente a las neoplasias que controlaría inmunológicamente la presencia de células anormales y las eliminaría (674) lo que da importancia al CMH en el control de la progresión tumoral. Sin embargo, recientemente, varias teorías proponen la implicación de los antígenos del CMH en el desarrollo de las neoplasias. La primera, establece la ineficacia del sistema inmune frente al antígeno asociado al tumor (tolerancia tumoral). La segunda describe el mecanismo por el que el tumor evita el control inmunológico (escape inmune) (675). También se ha sugerido que el sistema inmune favorece las variantes neoplásicas con inmunogenicidad reducida y, por tanto, el desarrollo de tumores capaces de evitar la detección y la respuesta inmune ("cancer immunoediting") (676). La tercera incide en que alelos específicos de HLA o haplotipos podrían predisponer al desarrollo de determinados tumores, aunque estos mecanismos no se han dilucidado completamente (673). Más aún, determinados haplotipos influyen el riesgo de desarrollar cáncer cervical (677), de mama (678), de ovario (679) o de riñón (680).

En melanomas, se ha demostrado que los antígenos HLA de clase I se pierden durante

la progresión tumoral y que, sin embargo, la expresión de los antígenos HLA de clase II aparece con la transformación neoplásica (681). Además, la demostración inmunohistoquímica de la expresión de dichas proteínas parece tener importancia pronóstica (682). En nuestro estudio, demostramos positividad nula o escasa para HLA de clase II en lesiones melanocíticas benignas: nevus congénitos (0%), nevus intradérmicos (2%) y nevus displásicos (0%), y ligera positividad en nevus de Spitz (2 de 25 casos, 8%). Tampoco en melanomas en fase de crecimiento radial se observa expresión de HLA-II (0%), aunque sí existe un ligero aumento en melanomas en fase de crecimiento vertical (8%), sin demostrar una diferencia significativa. Estos resultados coinciden con los obtenidos en algunos estudios previos (681,683,684,685). La expresión de las moléculas de HLA en líneas celulares de melanoma fue descrito por primera vez por *Wilson et al.* (1979) (686). Los melanocitos normales y los nevus comunes no expresan (0%) antígenos HLA de clase II (681,685). Sin embargo, los nevus displásicos pueden mostrar expresión local, pero en menos del 20% de las lesiones según las series (681,687). La expresión de HLA de clase II se ha observado hasta en el 40-70% de los melanomas primarios cutáneos (681,687). La frecuencia de su expresión en las metástasis de melanomas se ha identificado hasta en el 80-100% en metástasis locorregionales, y cutáneas (681-685). Finalmente no existen estudios que hasta el momento hayan tratado la expresión de dichos antígenos en nevus de Spitz, por lo que nuestros datos requieren futuras investigaciones, sobre series más amplias para validarlos. Sin embargo, basados en nuestros datos, la expresión de HLA II en estos nevus, que muestra discreta positividad, sugiere de nuevo su proximidad biológica con el melanoma. Los estudios hasta ahora realizados muestran una importante variabilidad en la inmunotinción de los melanomas (13-100% (560)), que probablemente se deba a las diferencias entre anticuerpos utilizados, que en la mayoría de los casos se realiza sobre muestras congeladas (681-685), mientras que nuestro estudio se ha llevado a cabo con un anticuerpo monoclonal frente a HLA DP, DQ, DR proporcionado por la Unidad de Anticuerpos Monoclonales del CNIO, sobre material fijado en formol e incluido en parafina. En algunos casos, la diferencia en la expresión de estas moléculas está relacionada con el punto de corte establecido, cuando el estudio no es semicuantitativo (681). Así, estos datos de la literatura demuestran un incremento en la expresión de las moléculas de HLA clase II con la progresión tumoral en el melanoma, sugiriendo su posible papel como marcador de la transformación maligna de las células névicas (685).

Varios autores han demostrado también una correlación entre la expresión de HLA de clase II y el espesor tumoral (681,683), el nivel de Clark (683), la incidencia de metástasis (683), y la menor supervivencia (684). A diferencia de otros tumores de mama, gástricos, colorrectales y escamosos de laringe, en los que existe una asociación entre la expresión de HLA-DR y un pronóstico favorable (688), la evidencia clínica sugiere que la expresión de las moléculas HLA de clase II, marcador de progresión tumoral, puede estar implicada en la inmunopatogénesis del melanoma. Las células del melanoma pueden procesar un antígeno tumoral y presentarlo

por medio de las moléculas HLA de clase II frente a los linfocitos T CD4+, dando lugar a una proliferación clonal de dichos linfocitos (689). Se ha demostrado (690) que estos linfocitos sufren cambios significativos en su fenotipo y en su función rápidamente después de su exposición al antígeno tumoral, lo que da lugar a un estado de insensibilidad frente a dicho antígeno, aunque los factores que inducen la anergia no han sido totalmente dilucidados por el momento. Además, estas células T CD4+ segregan una gran cantidad de INF-gamma (IFN- γ) y de interleuquina 10 (IL-10) e insignificantes cantidades de IL-2, IL-4, en respuesta a la presentación antigénica por el melanoma y por los linfocitos B (691,692). Niveles elevados de algunas citoquinas se han asociado a algunos estadios avanzados o recidivas de tumores sólidos (693-695) y, en melanomas, se ha observado que niveles particularmente elevados de IFN- γ están independientemente asociados a un incremento del riesgo de recidiva (696). La observación de que la expresión de los antígenos HLA-D en las células de melanoma juega un importante papel en el escape y la tolerancia del sistema inmune, ha hecho que se profundice en el estudio de la expresión de estas moléculas.

Finalmente, estudios recientes han identificado al menos dos alelos específicos HLA de clase II que se correlacionan con recidiva de la enfermedad y menor supervivencia (692), HLA-DRB1*1101, ha resultado ser un vaticinador independiente de la recidiva de melanoma en pacientes con enfermedad localizada, que además se correlaciona con niveles elevados de IFN- γ y menor supervivencia a los 5 años (53% vs. 70%; $p=0.007$) y HLA-DQB1*0301 se correlaciona con mayor riesgo de recidiva de melanoma y menor supervivencia a los 5 años (66% vs. 77% para pacientes que no expresan dicho alelo; $p=0.022$) (692).

Todos estos estudios coinciden en que existen interacciones entre la expresión de HLA y la inmunidad tumoral implicadas en la progresión del melanoma y que permiten identificar grupos de mayor riesgo de recidiva y peor supervivencia y que podrían ser potenciales beneficiarios de tratamientos con inmunoterapia adyuvante (697).

8.2. Topoisomerasa II α

Las ADN-topoisomerasas son enzimas celulares especializadas que estabilizan la tensión helicoidal de la doble hebra de ADN que se produce en los procesos de transcripción, replicación y recombinación del ADN, cortando temporalmente las cadenas de ADN en puntos estratégicos y uniéndolas de nuevo convenientemente (698). Este hecho repercute en el campo de la biología celular puesto que la tensión y la topología del ADN son parámetros que la célula modula para determinar la expresión o no de un gen y si una célula se duplica o no. En este sentido, una alteración en la actividad de las topoisomerasas podría ser uno de los factores implicados en el desarrollo de tumores (699). Las células de los mamíferos contienen dos isoformas de topoisomerasa II, las llamadas topoisomerasa II α , y II β . La topoisomerasa II β se expresa en células proliferantes y células quiescentes. La topoisomerasa II α , virtualmente

indetectable en la fase G_0 , se expresa principalmente durante la fase proliferativa de crecimiento y es la que centra nuestra atención en este trabajo. La cantidad de enzima se incrementa al inicio de la replicación del ADN y continúa incrementándose durante las fases S y G_2 hasta alcanzar sus valores máximos al final de G_2 -M para posteriormente disminuir al final de la mitosis (700,701).

En tejidos neoplásicos de alto grado es frecuente observar altos niveles de expresión de topoisomerasa II α , especialmente en estadios avanzados de cáncer de próstata (702), carcinoma de mama invasivo (703), carcinoma adrenocortical (704), sarcoma de partes blandas (705), linfoma no-Hodgkin de alto grado (706), y melanomas metastáticos (707,708). Los altos niveles de expresión de topoisomerasa II α se han correlacionado también en muchos tumores malignos con un peor pronóstico (703,705,706). Recientemente, varios estudios se han centrado en la expresión de la topoisomerasa II α en proliferaciones melanocíticas, su papel en la progresión tumoral y su potencial como diana terapéutica (709).

En nuestro estudio hemos observado positividad nula o escasa de Topoisomerasa II α en nevus melanocíticos: 0% en nevus congénitos, 2% en nevus intradérmicos (1 caso de 42), ligeramente mayor en nevus displásicos (4 casos de 23, 17%; diferencia no significativa frente a nevus intradérmicos), y en nevus de Spitz (4 casos de 26, 15%; p /S no significativa). En melanomas, se observa un incremento significativo en su expresión tanto en fase de crecimiento radial (76%; $pD/R=0.000$), como en fase de crecimiento vertical (79%; $pD/V=0.000$). En el único estudio previo (709), sobre muestras de lesiones melanocíticas benignas y malignas fijadas en formol e incluidas en parafina, se observó que los melanocitos normales de la epidermis no expresaban topoisomerasa II α , mientras que en la mayoría de nevus melanocíticos (hasta 57%), escasas y aisladas células mostraban positividad nuclear (58% de nevus intradérmicos, 67% de nevus displásicos, 60% de nevus de Spitz, considerando como positividad cualquier melanocito teñido). Estos autores (709) demostraron también positividad en la mayoría de melanomas primarios (87%), hasta el 82% en melanomas en fase de crecimiento radial, y 91% en fase de crecimiento vertical. En las lesiones in situ, es frecuente observar nidos y agregados positivamente teñidos para topo II α a lo largo de la unión dermo-epidérmica, con ocasionales células solitarias epidermotropas, mientras que, en tumores invasivos, la imagen más frecuente es la de células aisladas inmunoreactivas, homogéneamente distribuidas en todo el espesor del tumor. Estos resultados son comparables con los nuestros, si tenemos en cuenta el punto de corte escogido para nuestro estudio: $\geq 10\%$ de positividad nuclear.

Tanto los datos de la literatura como los observados en nuestro estudio sugieren que la topoisomerasa II α es un marcador de progresión tumoral. Es más, Mu *et al.* (709) demostraron que, teniendo en cuenta el modelo de progresión de Clark (121): de nevus adquirido común-nevus displásico-melanoma en fase de crecimiento radial-melanoma en fase de crecimiento vertical-melanoma metastático, y por métodos de regresión lineal, este incremento en la expresión de topoisomerasa II α en cada estadio de la evolución es significativo ($p=0.0001$), con

un coeficiente de correlación lineal positivo ($r=0.3$) (709). Podría ser considerado como un marcador molecular para diferenciar entre melanoma primario y lesiones melanocíticas benignas como el nevus de Spitz, aunque claramente no serviría como marcador definitivo.

Este estudio también demuestra una correlación significativa de la expresión de topoisomerasa II α en melanomas con el índice mitótico, el nivel de Clark, el espesor tumoral y con una menor supervivencia en el análisis multivariante (709).

Por otra parte, estudios *in vitro*, han demostrado la sensibilidad de las líneas celulares de melanoma a ciertos inhibidores de la topoisomerasa II α (710-712), como el etopósido, tenopósido, adriamicina, y doxorribicina (713-715) que son eficaces en muchos tumores de alto grado o invasivos como el carcinoma de células pequeñas de pulmón, carcinoma de mama avanzado, y linfoma de Hodgkin (713). El incremento de la expresión de la topoisomerasa II α que acompaña frecuentemente a la progresión de los melanomas, hace que estos agentes sean posibles fármacos de elección en la quimioterapia para el tratamiento sistémico. En estos casos es obligado el estudio inmunohistoquímico de las metástasis para seleccionar a los pacientes, aunque su expresión, altamente heterogénea, entre y dentro de los melanomas, dificulta su actividad (709). La resistencia oncológica a drogas citotóxicas se considera una de las mayores causas de fallo clínico de la quimioterapia. Casi el 50% de los pacientes con cáncer presentan tumores que son resistentes a los fármacos empleados, los cuáles han desarrollado resistencia durante el curso del tratamiento a pesar de haber presentado respuesta inicial al mismo (716). Muchos estudios con líneas celulares de melanomas muestran, quimio-resistencia frente a estos a los inhibidores de la topoisomerasa II α . Aunque los mecanismos implicados no están completamente dilucidados (710), se ha demostrado que la alteración de la expresión y de la actividad de la topoisomerasa II α confieren resistencia frente a sus inhibidores y resistencia cruzada frente a antraciclinas y mitoxantrona (717). Varios mecanismos pueden estar implicados en la alteración de la actividad de la topoisomerasa II α : la represión de la expresión celular (718), la modulación de la actividad catalítica mediante la fosforilación (717), o mutaciones en los genes que codifican la enzima (719). Se ha demostrado en células de melanoma resistentes al etopósido menos sensibilidad a la acción de los inhibidores de la topoisomerasa II α , causado por una mutación en el gen codificante de la Topo II α , resultante de una delección de la alanina 429 (717,719). Esta topoisomerasa II α mutante confiere una ventaja de crecimiento a las células de melanoma tratadas con etopósido, augurando un peor pronóstico.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Los nevus melanocíticos benignos representan una proliferación de células névicas, en las que el crecimiento celular (Ki-67, ciclina D1, topoisomerasa) está controlado por mecanismos reguladores del ciclo celular (expresión de p16, negatividad de survivina), que inducen a la senescencia de las células.
2. El nevus de Spitz constituye una lesión con comportamiento biológico intermedio “border-line” entre los nevus comunes (Ki-67, topoisomerasa) y los melanomas (altos niveles de ciclina D1, Rb, SPARC, osteopontina). Los niveles altos de p16, p21 y p53, sugieren un peso específico relativo de estos inhibidores del ciclo celular, relacionados con la inducción a la senescencia de los nevus de Spitz.
3. Muchos de los marcadores estudiados validan la teoría de la progresión biológica hacia la malignidad de las lesiones melanocíticas: nevus comunes-nevus displásicos-melanomas en fase de crecimiento radial-melanomas en fase de crecimiento vertical. Además, estas proteínas (receptores de membrana, ciclina D1, p21, p53, Rb, topoisomerasa) caracterizan al nevus displásico como una fase intermedia-inicial en la progresión tumoral.
4. Aunque ninguno de los anticuerpos estudiados ha demostrado especificidad absoluta para un determinado tipo de lesión nevus vs. melanoma, en la práctica clínica existen paneles de marcadores inmunohistoquímicos que nos pueden orientar el diagnóstico (Ki-67, topoisomerasa, survivina).
5. Sin embargo, en casos difíciles de diagnóstico diferencial entre nevus de Spitz y melanomas en fase de crecimiento vertical, la ciclina D1, p21, survivina, topoisomerasa II α , Ki-67, HMB-45, caveolina, SPARC y PKC α son proteínas diferencialmente expresadas ($p \sim 0.000$). Un estudio de Regresión logística con estas proteínas probablemente facilite el diagnóstico diferencial entre nevus de Spitz y melanoma. Estudios más amplios con nevus de Spitz atípicos y melanomas spitzoides son necesarios para corroborar nuestros hallazgos.
6. No existe marcador definitivo que caracterice a los melanomas, lo que se explica por una parte, por la heterogeneidad génica entre los diferentes subtipos y por otra parte, por la proliferación heterogénea de diferentes clones dentro de un mismo tumor.
7. Las moléculas implicadas en la transición epitelio-mesénquima (cadherinas, osteonectina, osteopontina, PKC α , y WT1), sobreexpresadas en las lesiones

melanocíticas profundas, favorecen la invasión de la dermis tanto en nevus benignos como en melanomas. No representan el elemento definitivo en la transformación maligna.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Weedon D, eds. Skin Pathology. London; New York: Churchill Livingstone; 2002.
2. Kroon S, Clemmensen OJ. Incidence of congenital melanocytic nevi in newborns babies in Denmark. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 565- 571.
3. Schleider SM, Lim SJM. Congenital nevi. *Int J Dermatol* 1995; 34: 825- 829.
4. Rhodes AR, Albert LS, Weinstock MA. Congenital melanocytic nevi: proportionate area expansion during infancy and early childhood. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 51- 62.
5. Fonseca Capdevila E. Tumores melanocíticos. En *Dermatología clínica*, 2º ed, 2001, ediciones Harcourt S.A., pp357- 364.
6. Swerdlow AJ, English JSC, Qiao Z. The risk of melanoma in patients with congenital nevi: a cohort study. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 595- 599.
7. Marghoob AA, Schoenbach SP, Kopf AW, et al. Large congenital melanocytic nevi and the risk for the development of malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1996; 132: 170- 175.
8. Kopf AW, Bart RS, Hennessey P. Congenital nevocytic nevi and malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1979; 1: 123- 130.
9. Dawson HA, Atherton DJ, Mayou B. A prospective study of congenital nevi: progress report and evaluation after 6 years. *Br J Dermatol* 1996; 134: 617- 623.
10. Weedon D. The Spitz naevus. *Clin Oncol* 1984; 3: 493- 507.
11. Lowes MA, Norris D, Whitfield M. Benign melanocytic proliferative nodules within a congenital nevus. *Australas J Dermatol* 2000; 41: 109- 111.
12. Ruiz- Maldonado R, del Rosario Barona-Mazuera M, Hidalgo Galvan LR, et al. Giant congenital melanocytic nevi, neurocutaneous melanosis and neurological alterations. *Dermatology* 1997; 195: 125- 128.
13. Holmes G, Wines N, Ryman W. Giant congenital melanocytic nevi and symptomatic thoracic arachnoid cyst. *Australas J Dermatol* 2001; 42: 124- 128.
14. Kadonaga JK, Frieden IJ. Neurocutaneous melanosis: definition and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 747- 754.
15. Tokuda Y, Saida T, Mukai K, Takasaki Y. Growth dynamics of acquired melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: 200- 224.
16. Cramer SF. The origin of epidermal melanocytes. *Arch Pathol Med Lab* 1991; 115: 115- 119.
17. Schomoeckel C. Classification of melanocytic nevi: do nodular and flat nevi develop differently? *Am J dermatopathol* 1997; 19: 31- 34.
18. Elder DE. Precursors to melanoma and their mimics: nevi of special sites. *Mod Pathol* 2006; 19: S4- S20.
19. Rock B. Pigmented lesions of the vulva. *Dermatol Clin* 1992; 10: 361- 370.
20. Maize JC, Ackerman AB. Pigmented Lesions of the Skin. *Clinicopathologic Correlations*. Lea & Febiger: Philadelphia, 1987.
21. MacKie RM, English J, Aitchison TC, et al. The number and distribution of benign pigmented moles (melanocytic nevi) in a healthy British population 1985; 113: 167- 174.
22. Rongioletti F, Urso C, Batolo D, et al. Melanocytic nevi of the breast: a histologic case-control study. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 137- 140. MacKie RM, English J, Aitchison TC, et al. The number and distribution of benign pigmented moles (melanocytic nevi) in a healthy British population 1985; 113: 167- 174.
23. Lund HZ, Stobbe GD. The natural history of the pigmented nevus: factors of age and anatomic location. *Am J Pathol* 1949; 25: 1117- 1147.
24. Fallowfield M, Collina G, Cook MG. Melanocytic lesions of the palm and sole. *Histopathology* 1994; 24: 463- 467.

25. Clemente C, Zurrida S, Bartoli C, Bono A, Collini P, Rilke F. Acral-lentiginous naevus of plantar skin. *Histopathology* 1995; 27: 549- 555.
26. Rongioletti F, Urso C, Batolo D, et al. Melanocytic nevi of the breast: a histologic case-control study. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 137- 140.
27. McCarthy SW, Scolyer RA. Melanocytic lesions of the face: diagnostic pitfalls. *Ann Acad Med Singapore* 2004; 33: 3- 14.
28. Saad AG, Patel S, Mutasim DF. Melanocytic nevi of the auricular region: histologic characteristics and diagnostic difficulties. *Am J Dermatopathol* 2005; 27: 111- 115.
29. Mandalia MR, Skillman JM, Cook MG, Powell BW. Halo nevus or malignant melanoma? A case report. *Br J Plast Surg* 2002; 55: 512-3.
30. Mooi WJ. Common acquired melanocytic nevi. In: Mooi WJ, Krauz T, ed. *Biopsy pathology of melanocytic disorders*. London: Chapman & Hall Medical, 1992.
31. Blessing K, Husssain A, Coburn P. "Benign naevi" in older individuals: diagnostic difficulties. *J Pathol* 1998; 186: 35A.
32. Kossard S, Commens C, Symons M, Doyle J. Lentiginous dysplastic nevi in the elderly: a potential precursor for melanoma. *Australas J Dermatol* 1991; 32: 27- 37.
33. Scolyer RA, Zhang L, Palmer AA, Thompson JF, McCarthy SW. Combined naevus: a benign lesion frequently misdiagnosed both clinically and pathologically as melanoma. *Pathology* 2004; 36: 419-27.
34. Kronberg R, Ackerman AB. Pseudomelanoma. *Arch Dermatol* 1975; 11: 1588- 1590.
35. Mehregan DA, Mehregan AH. Deep penetrating nevus. *Arch Dermatol* 1993; 129: 328- 31.
36. Muñoz C, Quintero A, Sanchez JL, Ruiz-Santiago H. Persistent blue nevus simulating melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50 (5 Suppl): S18- 20.
37. Sahin MT, Demir MA, Yoleri L, Can M, Ozturcan S. Blue naevus with satellitosis mimicking malignant melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15: 570-3.
38. Clark WH, Reimer RR, Greene M, Ainsworth Am, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. "The B-K mole syndrome". *Arch Dermatol* 1978; 114(5): 732-8.
39. Lynch HT, Frichot BC, Lynch JF, Familial multiple mole-melanoma syndrome. *J Med Genet* 1978; 15: 352.
40. Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, Greene MH, Clark WH. Dysplastic nevus syndrome: a phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. *Cancer* 1980; 46: 1787-1794.
41. Norris W. A case of fungoid disease. *Edinb Med Surg J* 1820; 16: 562
42. Cawley EP. Genetic aspects of malignant melanoma. *AMA Arch Dermatol* 1952; 65: 440.
43. Ackerman AB, Mihara I. Dysplasia, dysplastic melanocytes, dysplastic nevi, the dysplastic nevi and malignant melanoma. *Hum Pathol* 1985; 16: 87.
44. Ackerman AB, Elder DE. An exchange of ideas about dysplastic nevi and malignant melanomas. *Am J Dermatol* 1985; 7 (Suppl): 99-105.
45. Fusaro RM. Acquired Nonfamilial melanoma: an inappropriate conclusion. *Arch Dermatol* 1987; 123: 1595.
46. Ackerman AB. A "changing mole" is not the best clue to clinical detection of an "early" malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 1988; 280 (Suppl): S13-14.
47. Ackermann AB. What naevus is dysplastic, a syndrome and the commonest precursor of malignant melanoma? A riddle and an answer. *Histopathology* 1988; 13: 241.
48. Lambert WC, Crutcher WA. Diagnostic approaches to pigmented lesions. *J Cutan Pathol* 1989; 16: 177.
49. Clark WH, Ackerman AB. An exchange of views regarding the dysplastic nevus controversy. *Semin Dermatol* 1989; 8 (4): 229-250.
50. Sagebiel RW. The dysplastic melanocytic nevus. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 496.
51. Cook MG, Fallowfield ME. Dysplastic naevi- an alternative view. *Histopathology* 1990; 16: 29.
52. Ackerman AB, Magana-Garcia M. Naming acquired melanocytic nevi. Unna's, Miescher's, Spitz's, Clark's. *Am J*

- Dermatopathol 1990; 12: 193-209.
53. Murphy GF, Halpern A. Dysplastic melanocytic nevi. Normal variants or melanoma precursors? Arch Dermatol 1990; 126: 519-522.
 54. Roth ME, Grant-Kels JM, Ackermann AB et al. The histopathology of dysplastic nevi. Continued controversy. Am J Dermatol 1991; 13: 38.
 55. Shapiro PE. Making sense of the dysplastic nevus controversy. A unifying perspective. Am J Dermatopathol 1992; 14: 350-356.
 56. Cochran AJ. The role of the histopathologist in the diagnosis of dysplastic nevi. Histopathology 1994; 24: 589-590.
 57. Weinstock MA. Dysplastic nevi revisited. J Am Acad Dermatol 1994; 30: 807-810.
 58. Blessing K. Benign atypical naevi: diagnostic difficulties and continued controversy. Histopathology 1999; 34: 189-198.
 59. McNutt, Scott N. Dysplastic Nevus: Atypical Mole or typical Myth? Am J Surg Pathol 1999; 23: 1429-1433.
 60. Ackerman AB. Mythology and numerology in the sphere of melanoma. Cancer 2000; 88: 491-496.
 61. National Institutes of Health Consensus Conference: Precursors to malignant melanoma. J Am Acad Dermatol 1984; 251: 1864.
 62. NIH Consensus Development Conference: diagnosis and treatment of early melanoma. JAMA 1992; 268: 1314.
 63. Sagebiel RW, Banda PW, Schneider JS, et al. Age distribution and histologic patterns of dysplastic nevi. J Am Acad Dermatol 1985; 13: 975.
 64. Tong AFK, Murphy GF, Mihm MC. Dysplastic nevus. A formal histogenetic precursor of malignant melanoma. In: Mihm MC, Murphy GF, Kaufman N, eds. Pathobiology and recognition of malignant melanoma. Baltimore: Williams and Wilkins, 1988: 10.
 65. Rhodes AR, Sober AJ, Mihm MC, et al. Possible risk factors for primary cutaneous malignant melanoma. Clin Res 1980; 28: 252 A.
 66. Kraemer KH, Greene MH, Tarone RE, et al. Dysplastic naevi and cutaneous melanoma risk. Lancet 1983; 2: 1076.
 67. Crutcher WA, Sagebiel RW. Prevalence of dysplastic nevi in a community practice (Letter). Lancet 1984; 1: 729.
 68. McCarthy WH, Coates AS. The dysplastic naevus syndrome: identifying the at-risk patient. Pat Manag 1985; 14: 43.
 69. Nordlund JJ, Kirkwood J, Forget BM, et al. Demographic study of clinically atypical (dysplastic) nevi in patients with melanoma and comparison subjects. Canc Res 1985; 45: 1855.
 70. Grob JJ, Andrac L, Romano MH, et al. Dysplastic naevus in non-familial melanoma. A clinico-pathological study of 101 cases. Br J Dermatol 1988; 118: 745.
 71. Cooke KR, Spears GFS, Elder DE, et al. Dysplastic naevi in a population-based survey. Cancer 1989; 63: 1240.
 72. Augustsson A, Stieerner U, Suukürla M, et al. Prevalence of common and dysplastic nevi in a Swedish population. Br J Dermatol 1991; 124: 152.
 73. Weinstock MA, Barnhill RL, Rhodes AR. Reliability of the histopathologic diagnosis of melanocytic dysplasia. Arch Dermatol 1997; 133: 953.
 74. Barnhill RL, Hurwitz S, Duray PH, et al. The dysplastic nevus: recognition and management. Plast Reconstr Surg 1988; 81: 230.
 75. Barnhill RL, Roush GC, Ernstoff MS, et al. Interclinician agreement on the recognition of selected gross morphologic features of pigmented lesions. J Am Acad Dermatol 1992; 26: 185.
 76. Rhodes AR, Weinstock MA, Fitzpatrick TB, et al. Risk factors for cutaneous melanoma. A practical method of recognition predisposed individuals. J Am Med Assoc 1987; 258: 3146.
 77. Marks R, Dorevitch AP, Mason G. Do all melanomas come from moles? A study of the histological association between melanocytic nevi and melanoma. Australas J Dermatol 1990; 31: 77.
 78. Green A, Mac Lennan R, Siskind V. Common acquired nevi naevi and the risk of malignant melanoma. Br J Dermatol 1985; 35: 297-300.

79. Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ. Benign melanocytic lesions: Risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 1000-7.
80. Holman CD, Armstrong BK. Pigmentary traits, benign nevi and family history as risk factors for CMM. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 257- 266.
81. Augustsson A, Stierner U, Rosdahl nl, et al. Common and dysplastic nevi as risk factors for CMM in a Swedish population. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1991; 71: 518- 524.
82. Elder DE, Greene MH, Bondi EE, et al. Acquired melanocytic nevi and melanoma: the dysplastic nevus syndrome. En: Ackerman AB, ed. *Pathology of malignant melanoma*. New York. Masson 1981; pp185.
83. Skender- Kalnenas, English DR, et al. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 1000.
84. Kopf AW, Rivers JK, Slue W, et al. Photographs are useful for detection of malignant melanomas in patients who have dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 1132.
85. 136. Barnes LM, Nordlund JJ. The natural history of dysplastic nevi. A case history illustrating their evolution. *Arch Dermatol* 1987; 123: 1059.
86. Halpern Ac, Guerry IV DP, Elder DE, et al. Natural history of dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 51.
87. Slade J, Marghoob AA, Salopek TG, et al. Atypical mole syndrome: risk factor for cutaneous malignant melanoma and implications for management. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 479.
88. Darier J, Civatte A. Naevus ou naevo-carcinoma chez un nourisson. *Bull Soc Franc Derm Syph* 1910 ; 21 : 61-63.
89. Spitz S. Melanomas of childhood. *Am J Pathol* 1948; 24: 591-609.
90. Barnhill RL. The Spitzoid lesion: rethinking Spitz tumors, atypical variants, "Spitzoid melanoma" and risk assessment. *Mod Pathol* 2006; 19 Suppl 2: S21-S33.
91. Echevarria R, Ackerman LV. Spindle and epithelioid cell nevi in the adult, clinicopathologic report of 26 cases. *Cancer* 1967; 20: 175- 189.
92. Paniago-Pereira C, Maize JC, Ackerman AB. Nevus of large spindle and/or epithelioid cells (Spitz's nevus). *Arch Dermatol* 1978; 114: 1811-23.
93. Weedon D, Little JH. Spindel and epithelioid cell nevi in children and adults. A review of 211 cases of the Spitz nevus. *Cancer* 1977; 40: 217- 25.
94. Nikai H, Miyauchi O, Ogawa I, Takata T, hayashi Y, Okazaki H. Spitz nevus of the palate. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69: 603-8.
95. Kamino H, Flotte TJ MB, Greco MA, Ackerman AB. Eosinophilic globules in Spitz's nevi, new findings and a diagnostic sign. *Am J Dermatopathol* 1979; 1: 319- 324.
96. Allen A. A reorientation of the histogenesis and clinical significance of cutaneous nevi and melanoma. *Cancer* 1949; 2: 28- 56.
97. Allen A, Spitz S. Malignant melanoma: a clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. *Cancer* 1953; 6: 1- 45.
98. Smith KJ, Barrett TL, Skelton HG 3rd, Lupton GP, Graham JH. Spindle cell and epithelioid cell nevi with atipia and metastasis (malignant Spitz nevus). *Am J Surg Pathol* 1989; 13: 931-9.
99. Skelton HG 3rd, Smith KJ, Holland TT, Tomaszewski MM, Lupton GP. Malignant Spitz nevus. *Int J Dermatol* 1992; 31: 639- 41.
100. Nitta Y, Ohkochi Y, Hara K. "Malignant Spitz nevus" in a 2-year-old Japanese child. *J Dermatol* 1995; 22: 500-3.
101. Urso C, Borgogni L, Saieva C, Ferrara G, Tinacci G, Begliomini B, et al. Sentinel lymph node biopsy in patients with "atypical Spitz tumors". A report on 12 cases. *Human Pathol* 2006; 37: 816-23.
102. Haupt HM, Stern JB. Pagetoid melanocytosis: histologic features in benign and malignant lesions. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 792- 797.

103. Busam KJ, Barnhill RL. Pagetoid Spitz naevus: intraepidermal Spitz tumour with prominent pagetoide spread. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 1061- 1067.
104. Barnhill RL, Argenyi ZB, From, L, Glass LF, Maize JC, Mihm MC Jr, et al. Atypical Spitz nevi/tumors: lack of consensus for diagnosis, discrimination from melanoma and prediction of outcome. *Hum Pathol* 1999; 30: 513- 20.
105. Reed RJ, Ichnose H, Clark WH, Mihm MC. Common and uncommon naevi and borderline melanomas. *Semin Oncol* 1975; 2: 119- 147.
106. Smith NP. The pigmented spindle cell tumour of Reed: an underdiagnosed lesion. *Semin Diagn Pathol* 1987; 4: 75- 87.
107. Barnhill RL, Mihm MC. Pigmented spindle cell nevus and its variants: distinction from melanoma. *Br J Dermatol* 1989; 121: 717- 726.
108. Prada López MP, Cuesta Romero C, Zamora Parra B. Tema 13. Melanoma. En "Manual de Cirugía Plástica", Sociedad Española de Cirugía Plástica, 2001, (www.secp.org).
109. Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S-J: "Cutaneous Melanoma" 3rd ed, QMP, Inc., 1998.
110. Kibbi AG, Sober AJ, Mihm MC Jr.: "Malignant Melanoma". En: Grabb and Smith's Plastic Surgery 4th ed., Little Brown 1991. 26: 759-777.
111. American Cancer Society. Learn about skin cancer-melanoma 2007. Atlanta, GA: American Society; 2007 (www.cancer.org).
112. Schreiber MM, Bozzo PD, Moon TE. Malignant melanoma in southern Arizona: increasing incidence and sunlight as an etiologic factor. *Arch Dermatol* 1981;117: 6-11.
113. Lamberg L. Epidemic" of malignant melanoma. True increase or better detection? *JAMA* 2002;287: 2201.
114. Garcia-Foncillas J. Genetic diagnosis in medicine, 1998 (www.clinicauniversitariadenavarra.es).
115. Crowley N. Malignant Melanoma in black Americans. A trend toward improved survival. *Arch Surg* 1991; 126: 1359- 1365.
116. Geller AC, Miller DR, Annas G, Demierre MF, Gilcherest BA .Melanoma Incidence and mortality among US whites, 1969-1999. *JAMA* 2002; 288:1719-1720.
117. Beddingfield FC. The Melanoma Epidemic: Res Ipsa Loquitur. *The Oculogist* 2003; 8: 459-465.
118. Zamora B, Casado C: Melanoma. I Ponencia Oficial de la SECPRE. ENE Ediciones, 1998.
119. Mastrangelo MJ, Baker AR, Katz HR: "Melanoma cutáneo". En: "Cáncer. Principios y Práctica de Oncología" de Vincent T. DeVita Jr., Samuel Hellman y Steven A. Rosenberg, 2^a ed, Salvat 1988. 39: 1279-1326.
120. Foulds L. Multiple etiologic factors in neoplastic development. *Cancer Research* 1965; 25: 1339-1347.
121. Clark WH, Elder DE, Guerry D, Epstein M, Greene MD, Van Horn M. A Study of tumor Progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984; 15: 1147-1165.
122. Puig L. Oncogenes y genes supresores tumorales en el melanoma maligno cutáneo. *Act Dermatolog* 1997; 10: 705- 713.
123. Crowson NA, Magro CM, Mihm MC. The melanocytic proliferations: a comprehensive textbook of pigmented lesions. Wiley-Liss, 2001
124. Clark WH. The nature of cancer: morphogenesis and progressive (self)-disorganization in neoplastic development and progression. *Acta Oncologica* 1995; 34: 3-21.
125. Clark WH, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol* 1986; 17: 443-50.
126. Merkow LP, Burt RC, Hayeslip DW, Newton FT, Slifkin M, Pardo M. A cellular and malignant blue nevus: a light and electron microscopic study. *Cancer* 1969; 24: 888-896.
127. Contey J, Lattes R, Orr W. Desmoplastic malignant melanoma (a rare variant of spindle cell melanoma). *Cancer* 1971; 28: 914-936.
128. Schmoeckel C, Castro CE, Braun-Falco O. Nevroid malignant melanoma. *Arch Derm Res* 1985; 277: 362-369.
129. Rutten A, Huschka U, Requena C, Rodríguez-Peralto JL, Requena L. Primary cutaneous signet-ring cell melanoma: A clinicopathologic and immunohistochemical study of two cases. *Am J Dermatopathol* 2003; 25:418- 422.

130. Stolz W, Schmoeckel C, Welkovich B, Braun-Falco O. Semiquantitative analysis of histologic criteria in thin malignant melanomas. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20:115-1120.
131. Elder DE, Jucovy PM, Tuthill RJ, Clark WH Jr. The classification of malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1980; 2: 315- 320.
132. Redondo P. Actualización en melanoma: incidencia, desarrollo y aspectos biológicos. *Anales del sistema de salud de Navarra*, 2007(www.cfnavarra.es)
133. Hutchinson J. Senile freckles. *Arch Surg (London)* 1892; 3: 319.
134. Weinstock MA, Sober AJ. The risk of progression of lentigo maligna to lentigo maligna melanoma. *Br J Dermatol* 1987; 116: 303-310.
135. Cohen LM. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:923-936.
136. Trotter MJ, Tron VA. Dermal vascularity in lentigo maligna. *J Pathol* 1994;173: 341-345.
137. Weyers W, Euler M, Diaz Cascajo C, et al. Classification of cutaneous malignant melanoma. A reassessment of histopathologic criteria for the distinction of different types. *Cancer* 1999; 86: 288- 299.
138. de Almeida LS, Requena L, Rütten A, Kutzner H, Garbe C, Pestana D, Gomes MM. Desmoplastic malignant melanoma: a clinicopathologic analysis of 113 cases. *Am J Dermatopathol*. 2008; 30:207-15.
139. Duray PH. Dysplastic Nevus. En: Demis J, Dobson RL, McGuik JS, eds. *Clinical Dermatology*. Filadelfia: JB Lippincott. 1993; 9:168-73.
140. Díaz Rubio E, García Conde J. *Oncología Clínica Básica*. Arán Ediciones. 2000; 499-510.
141. Garrido Ruiz MC, Rodríguez Peralto JL. Factores pronósticos del melanoma. *Rev Canc* 2007; 21: 162-169.
142. Iglesias Díez L, Guerra Tapia A, Ortiz Romero P. *Tratado de Dermatología*. Luzán SA de Ediciones Madrid, 2000.
143. Kelly JW, Sagebiel RW, Calderon W, et al. The frequency of local recurrence and microsatellites as a guide to reexcision margins for cutaneous malignant melanoma. *Ann Surg* 1984; 200: 759-763.
144. Green MS. The changing controversy over surgical resection margins for stage I cutaneous melanoma. *Mt Sinai Med J* 1991; 58: 341-346.
145. O'Rourke MGE, Altmann CR. Melanoma recurrente alter escisión. Is a wide margin justified? *Ann Surg* 1993; 217 2-5.
146. Day CL, Lew RA. Malignant melanoma prognostic factors : Surgical margins. *J Dermatol Surg Oncol* 1983; 9: 797-801.
147. Johnson TM, Smith JWII, Nelson BR, Chang A. Current therapy for cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 689-707.
148. Morton DL, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127: 392.
149. Maeurer MJ and Lotze MT: immune responses to Melanoma Antigens. In Balch CM et al, eds. *Cutaneous Melanoma*, 3rd Edition. Quality Medical Publishing. Inc. St Louis, 1998, pp 517.
150. De Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DB y col. Final version of the American Joint committee on Cancer Staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19:3635-48.
151. Hunter, D. J., Hankinson, S. E., Laden, F., Colditz, G. A., Manson, J. E., Willett, W. C., Speizer, F. E., Wolff, M. S.. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med* 1997; 337: 1253-1258.
152. Nurse, P., y Bissett, Y. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeasts. *Nature* 1981; 292: 558-560.
153. Schneider BL, Kulesz-Martin M. Destructive cycles; the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2033-2044.
154. H. C. Pitot III and Y. P. Dragan. Chemical Carcinogenesis. In Casaret and Doulls *Toxicology* V edition. C D. Klaasen (eds). Mc Graw-Hill. New York. pp 201-267. 1996.
155. Domínguez Boada L. Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal. *Biocáncer* 2004;1:1-9.

-
156. Miller AJ, Mihm MC. Mechanisms of disease Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355: 51-65.
 157. Ackerman AB, Mihara I. Some questions and answers about dysplasia, dysplastic melanocytes, dysplastic nevi, the dysplastic nevus syndrome, and the relationship of dysplastic nevi to melanoma. *Hum Pathol* 1985; 16: 87-91.
 158. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
 159. Pitot HC. Animal models of neoplastic development. *Dev Biol Basel* 2001; 106: 53-57; discussion 57-59, 143-160.
 160. Mancianti ML, Herlyn M. Tumor progression in melanoma: the biology of epidermal melanocytes in vitro. *Carcinog Compr Surv* 1989; 1: 369-86.
 161. Herlyn M, Clark WH, Rodeck U, Mancianti ML, Jambrosic J, Koprowski H. Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 1987; 56: 461-74.
 162. Kath R, Rodeck U, Menssen HD, Mancianti ML, Linnenbach AJ, Elder DE, Herlyn M. *Anticancer Res* 1989; 9: 865-72.
 163. Rowley JD. Molecular cytogenetics: Rosetta Stone for understanding cancer- Twenty-Ninth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1990; 5: 3816-25.
 164. Nowell PC. Biology of disease: cancer, chromosomes and genes. *Lab Invest* 1992; 12: 5-24.
 165. Fowles DJ, Balmain A. Oncogenes and tumour suppressor genes in transgenic mouse models of neoplasia. *Eur J Cancer* 1993; 29: 638-45.
 166. Harris CC, Hirohashi S. United States-Japan seminar on genomic instability during carcinogenesis and tumor progression. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 1108-11.
 167. Lejeune FJ, Chaundhuri PK, Das Gupta PK, eds. *Malignant Melanoma; medical and surgical management*. New York, NY: Mc Graw-Hill; 1994.
 168. Kibel AS, Isaacs WB. G1/S cell cycle proteins as markers of aggressive prostate carcinoma. *Urology* 2000; 55: 316-322.
 169. Hinds PW, Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 135-141.
 170. Baserga R. Oncogenes and strategy of growth factors. *Cell* 1994; 79: 927- 930.
 171. Kamb A. Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet* 1995; 11: 136-140.
 172. Fountain JW, Bale SJ, Housman DE, Dracopoli NC. Genetics of melanoma. *Cancer Surv* 1990; 9: 645- 671.
 173. Halpern AC, Altman JF. Genetic predisposition to skin cancer. *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 132- 138.
 174. Slominski A, Worstman J, Nickoloff B, Mc Clatchey K, Mihm M, Ross JS. Molecular pathology of malignant melanoma. *Am J Clin Pathol* 1998; 110: 788-794.
 175. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in the p16 Ink4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996; 12: 97- 99.
 176. Kamb A, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440.
 177. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Scherr CJ. Alternative reading frames of the INK4A tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83: 993-1000.
 178. Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 559-570.
 179. Naylor MF, Everett MA. Involvement of the p16 Ink4 (CDKN2) gene in familial melanoma. *Melanoma Res* 1996; 6: 139-145.
 180. Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994; 8: 15-21.
 181. Goldstein A, Dracopoli N, Engelstein M, Fraser M, Clark WJ, Tucker M. Linkage of cutaneous malignant melanoma/dysplastic nevi to chromosome 9p, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 489-496.
 182. Cannon-Albright L, Goldgar D, Meyer L, Lewis C, et al. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science* 1992; 258: 1148- 1152.
 183. Wang Y, Becker D. Differential expression of the cyclin dependent kinase inhibitors p16 and p 21 in the human
-

- melanocytic system. *Oncogene* 1996; 12: 1069- 1075.
184. Bataille V. Current perspectiva genetic epidemiology of melanoma. *Eur. J Canc* 2003; 39: 1341- 1347.
185. Piccinin S, et al. P16/CDKN2A and CDK4 gene mutations in sporadic melanoma development and progression. *Cancer* 1997; 74: 26-30.
186. Straume O, Smeds J, Kaumar R, Hemminki K, Akslen LA. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540C T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma in vertical growth phase. *Am J Pathol* 2002; 161: 229- 237.
187. Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes and development* 2006; 20: 2149- 2182.
188. Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and mdm2. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 8292- 8297.
189. Xiao Z, Chen J, Levine A, Modjtahedi N, Xing J, Sellers W, et al.. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein mdm-2. *Nature* 1995; 375: 694-97.
190. Qin X, Chittenden T, Livingston D, Kaelin W. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev* 1992; 6: 953-64.
191. Martin K, Trouche D, Hagemeier C, Sorensen T, La Thangue N, Kouzarides T. Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by mdm-2 oncoprotein. *Nature* 1995; 375: 691-4.
192. Soufir N, et al. Prevalence of P16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 209-215.
193. Goldstein AM, Struelwings JP, Chidambaram A, Fraser MC, Tucker MA. Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1006- 1010.
194. Sotillo R, et al. Invasive melanoma in CDK4-targeted-mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001; 98: 13312-13317.
195. Gillanders E, Juo SH, Holland EA, et al. Localization of a novel melanoma susceptibility locus to 1p22. *Am J Hum Genet.* 2003;73: 301-13.
196. Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genet* 1995; 11: 328-330.
197. Avilés JA, Lázaro P. Genetic predisposition in cutaneous melanoma. *Actas Dermosifiliogr* 2006; 97: 229-40.
198. Box NF, et al. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet* 2001; 10: 1701-1708.
199. Healy E, et al. Melanocortin-1-receptor gene and sun sensitivity in individuals without red hair. *Lancet* 2000; 355: 1072- 1073.
200. Harsanyi ZP, Post PW, Brinkmann JP, Chedekel MR, Deibel RM. Mutagenicity of melanin from human red hair. *Experientia* 1980; 36: 291-292.
201. Glaess A, Bosserhoff AK, Buettner R, Hohenleutner U, Landthaler M, Stolz W. Increase telomerase activity during progression of melanocytic cells from melanocytic naevi to malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 81- 87.
202. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410: 37- 40.
203. Safari M, et al. Analysis of RAS mutation in human melanocytic lesions: activation of the ras gene seems to be associated with the nodular type of human malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121: 23-30.
204. Papp T, et al. Mutational analysis of the N-ras, p53, p16INK4, CDK4 and MC1R genes in human congenital melanocytic naevi. *J Med Genet* 1999; 36: 610- 614.
205. Demunter A, Stas M, Degreef H, De Wolf-Peeters C, Van der Oord JJ. Analysis of N and K-ras mutation in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1483-1489.
206. Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H, et al. Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res* 2000; 60: 1968-1973.
207. Davies H, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954.

-
208. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D, Bastian BC. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1878-1890.
209. Cohen C, et al. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3728-3733.
210. Mihic-Probst D y Perren A. Absence of BRAF gene mutations differentiates Spitznevi from malignant melanoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 2415-8.
211. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004; 6: 313-319.
212. Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JR, et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* 2005; 15: 249-254.
213. Bottaro DP, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991; 251: 802-804.
214. Li G, et al. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 2001; 20: 8125-8135.
215. Natali PG et al. Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br J Cancer* 1993; 68: 746-750.
216. Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Bocker EB, Pinckel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1998; 58: 2170-2175.
217. Jeffers M, Schimdt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T, Zbar B, Vande Woude GF. Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 11445-11450.
218. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signalling pathways in melanoma. *Oncogene* 2003; 22: 3113-3122.
219. Stambolic V, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumour suppressor PTEN. *Cell* 1998; 95: 29-39.
220. Meier F, Schitteck B, Busch S, Garbe C, Smalley K, Satyamoorthy K, Li G, Herlyn M. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signalling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci* 2005; 10: 2986-3001.
221. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer* 2005; 24: 273-285.
222. Hwang PH, et al. Supresión of tumorigenicity and metastasis in B16F10 cells by PTEN/MMAC1/TEP1 gene. *Cancer Lett* 2001; 172: 83-91.
223. Teng DH, et al. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimen and tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 5221-5225.
224. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353; 20: 2135-2147.
225. Hughes MJ, Lingrel JB, Krakowsky JM, Anderson KP. A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus. *J Biol Chem* 1993; 268: 20687-90.
226. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhi R, Milner DA, Granter SR, Du J, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005; 436: 117-122.
227. Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 365-411.
228. Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 2005; 307: 720-4.
229. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine* 2006; 12 (9): 406-413.
230. Golding C, Meyskens FL. Microphthalmic-associated transcription factor integrates melanocyte biology and melanoma
-

- p>progression. Clin Cancer Res 2006; 12: 1069-1073.
231. Vance KW, Goding CR. The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. Pigment Cell Res 2004; 17: 318-25.
 232. King R, Weilbaecher KN, Mc Gill G, Cooley E, Mihm M, Fisher DE. Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for melanoma diagnosis. Am J Pathol 1999; 155: 731- 738.
 233. Du J, Widlund HR, Horstmann MA, et al. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. Cancer Cell 2004; 6: 565-76.
 234. Widlund HR, Horstmann MA, Price ER, et al. B-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target microphthalmia associated transcription factor. J Cell Biol 2002; 158: 1079-87.
 235. Carreira S, Goodall J, Aksan I, et al. MITF cooperates with RB1 and activated p21CIP1 expression to regulate cell cycle progresión. Nature 2005; 433: 764-769.
 236. Wellbrock C, Marais R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-simulated melanocyte and melanoma cell proliferation. J Cell Biol 2005; 170: 703-708.
 237. Mc Gary, Chelouche Lev D, Bar-Eli M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. Cancer boil & therapy 2002; 5: 459- 465.
 238. Grunert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 657-665.
 239. Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Perez-Gomez B, Palacios J, Pollan M, Linares J, Serrano S, Sáez-Castillo AI, Sanchez L, Pajares R, Sánchez-Aguilera A, Artiga MJ, Piris MA, Rodriguez- Peralto JL. A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. Cancer Res 2007; 67: 3450- 3460.
 240. Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. Cancer Metastasis Rev 1999; 18: 345-357.
 241. Clothia C, Jones EY. The molecular structure of cell adhesion molecules. Ann Rev Biochem 1997; 66: 827-862.
 242. Buck CA. Adhesión mechanisms controlling cell-cell and cell-matrix interactions during the metastatic process. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta (eds). The molecular basis of cancer. W.B. Saunders, 1995, pp172- 205.
 243. Herlyn M, Berking C, Li G, Satyamoorth K. Lesson from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. Melanoma Res 2000; 10: 303-12.
 244. Bienz M. β -catenine: a pivot between cell adhesión and Wnt signalling. Curr Biol 2005; 15: R64-R67.
 245. Brembeck FH, Schwartz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. Genes Dev 2004; 18: 2225- 30.
 246. Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, Bruton R, Marsden JR, Jankowski J. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumor. Mol Pathol 1999; 52: 151-7.
 247. Shtutman M, Zhurinsky J, SIMCA I, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta catenin/LEF-1 pathway. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 5522-7.
 248. Rimm DL, Caca K, Hu G, Harrison FB, Fearon ER. Frequent nuclear/cytoplasmic location of β -catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. Am J Pathol 1999; 154: 325-9.
 249. Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of β -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. Science 1997; 275: 1790-2.
 250. Robbins PF, El-Gamil E, Li Y-F, Kawakami Y, Loftus D, Appella E, Rosenberg SA. A mutated β -catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumour infiltrating lymphocytes. J Exp Med 1996; 187: 1185- 92.
 251. Kageshita T, Hamby CV, Ishihara T, Matsumoto K, Saida T, Ono T. Loss of β -catenin expression was associated with disease progression in malignant melanoma. Br J Dermatol 2001; 145 (2): 210-216.
 252. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. Cancer Metastasis Rev 2005; 24: 195- 222.
 253. Valyi-Nagy IT, Hirka G, Jensen PJ, Shih IM, Juhasz M. Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology and

- antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. *Lab Invest* 1993; 69: 152- 9.
254. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996; 1: 188-194.
255. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signalling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 2001; 153: 1049-1060.
256. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 3819-3825.
257. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GN. Coexpression of integrin alpha(v)beta3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 625-632.
258. Petittclerc E, Stromblad S, von Schalscha TL, et al. Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res* 1999; 59: 2724-2730.
259. Li X, Regezi J, Ross FP, et al. Integrin alphavbeta3 mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 2001; 114: 2665-2672.
260. Jendraschak E, Sage EH. Regulation of angiogenesis by Sparc and angiostatin; implications for tumor cell biology. *Semin Cancer Biol* 1996; 7: 39- 46.
261. Ledda F, Bravo AI, Adris S, et al. The expresión of the secreted proyein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 210-214.
262. Zhou Y, Dai DL, Martinka M, et al. Osteopontin expression correlates with melanoma invasion. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 1044-52.
263. Kabbarah O, Chin L. Revealing the genomic heterogeneity of melanoma. *Cancer Cell* 2005; 8: 439- 441.
264. Becker B, Roesch A, Hafner C, Stolz W, Dugas M, Landthaler M, et al. Discrimination of melanocytic tumours by cDNA array hybridation of tissues prepared by laser pressure catapulting. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 361- 368.
265. Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, Perez Gomez B, Sanchez L, Acuna MJ, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray based study. *Am J Pathol* 2004; 164: 193-203.
266. Seykora JT, Jih D, Elenitsas R, Horng WH, Elder DE. Gene expression profiling of melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2003; 25: 6- 11.
267. Carlsos JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, Mihm M Jr. Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52: 743- 75.
268. Carlson JA, Slominski A, Linette GP, Mihm MC Jr, Ross JS. Biomarkers in melanoma: predisposition, screening and diagnosis. *Expert Rev Mol Diag* 2003; 163: 1765- 70.
269. Van Dijk MC, Rombout PD, Mooi WJ, Van de Molengraft FJ, Van Krieken JH, Ruiter DJ, et al. Allelic imbalance in the diagnosis of benign, atypical and malignant Spitz tumours. *J Pathol* 2002; 197: 170-8.
270. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit P, Pinkel D. Classifying melanocytic tumours based on DNA copy number changes. *Am J Pathol* 2003; 163: 1765- 70.
271. Slominski A. Coming of age of melanogenesis-related proteins. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 775-7.
272. Blessing K, Sanders DS, Grant JJ. Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. *Histopathology* 1998; 32: 139- 146.
273. Park HR, Min SK. Expression of S100A2 and S100B proteins in epithelial tumors of the skin. *J Cutan Pathol* 2003; 30: 373- 378.
274. Sundram U, Harvell JD, Rouse RV, Natkunam Y. Expression of the B-cell proliferation marker MUM1 by melanocytic lesions and comparison with S100, gp100 (HMB45), and Melan A. *Mod Pathol* 2003; 16: 802- 810.
275. Dorvault CC, Weilbaeher KN, Yee H, et al. Microphthalmia transcription factor: a sensitive and specifis marker for malignant melanoma in cytologic specimens. *Cancer* 2001; 93: 337- 343.

276. Busam KJ, Iversen K, Coplan KC, Jungbluth AA. Analysis of microphthalmia transcription factor expression in normal tissues and tumours and comparison of its expression with S-100 protein, gp100, and tyrosinase in desmoplastic malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 197- 204.
277. Slingluff CL Jr, Cololla TA, Thompson L, et al. Melanomas with concordant loss of multiple melanocytic differentiation proteins: immune escape that may overcome by targeting unique or undefined antigens. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 48: 661- 672.
278. Salazar-Onfray F, Lopez M, Lundqvist A, et al. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br J Cancer* 2002; 87: 414- 422.
279. De Wit NJW, Van Muijen GNP, Ruiter DJ. Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions. *Histopathology* 2004; 44: 517- 541.
280. Aonuma M, Iwahana M, Nakayama Y, et al. Tumorigenicity depends on angiogenic potencial of tumour cells: dominant role of vascular endothelial growth factor and/or fibroblast growth factors produced by tumour cells. *Angiogenesis* 1998; 2: 57-66.
281. Simonetti O, Lucarini G, Brancorsini D, et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. *Cancer* 2002; 95: 1963- 1970.
282. Ueda M, Funasaka Y, Ichihashi M, Mishima Y. Stable and strong expression of basic fibroblastic growth factor in naevus cell naevus contrast with aberrant expression in melanoma. *Br J Dermatol* 1994; 130: 320- 324.
283. Reed JA, McNutt NS, Albino AP. Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridation. Implications for tumour progression. *Am J Pathol* 1994; 144: 329- 336.
284. Clarijs R, Schalkwijk L, Hoffmann UB, Ruiter DJ, De Waal RM. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 expression on tumour microvasculature as a new progression marker in human cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2002; 13: 301- 307.
285. Teicher BA. Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta. *Cancer metastasis Rev* 2001; 20: 133- 143.
286. Moretti S, Pinzi C, Spallanzani A, et al. Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *Int J Cancer* 1999; 20: 160- 168.
287. de Wit PE, Moretti S, Koenders PG, et al. Increasing epidermal growth factor receptor expression in human melanocytic tumour progression. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 168- 173.
288. Udart M, Utikal J, Krahn GM, Peter RU. Chromosome 7 aneusomy. A marker for metastatic melanoma? Expression of the epidermal growth factor gene and chromosome 7 aneusomy in naevi, primary malignant melanomas and metastases. *Neoplasia* 2001; 3: 245- 254.
289. Ledda F, Bravo AI, Adris S, Bover L, Mordoh J, Pdhajcer OL. The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 210- 214.
290. Ohashi A, Funasaka Y, Ueda M, Ichihashi M. c-Kit receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanotic naevi. *Melanoma Res* 1996; 6: 25- 30.
291. Woenckhaus C, Giebel J, Failing K, Fenic I, Dittberner T, Poestch M. Expression of AP-2alpha, c-kit and cleaved caspase-6 and -3 in naevi and malignant melanomas of the skin. A possible role for caspases in melanoma progression? *J Pathol* 2003; 201: 278- 287.
292. Celebi JT, Shendrik I, Silvers DN, Peacocke M. Identification of PTEN mutations in metastatic melanoma specimens. *J Med Genet* 2000; 37: 653- 657.
293. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumour suppressor. *Exp Cell Res* 2001; 264: 29- 41.
294. Tsao H, Mihm MC Jr, Sheehan C. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 865- 872.

-
295. Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, Pavey S, Hayward NK, Eng C. Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 2002; 99: 63- 67.
 296. Dhawan P, Singh AB, Ellis DL, Richmond A. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumour progression. *Cancer Res* 2002; 62: 7335- 7342.
 297. Huang S, Jean D, Luca M, Tainsky MA, Bar EM. Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J* 1998; 17: 4358- 4369.
 298. Bohm M, Moellmann G, Cheng E, et al. Identification of p90RSK as the probable CREB-Ser133 kinase in human melanocytes. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 291- 302.
 299. Ostmeier H, Fuchs B, Otto F, Mawick R, Lippold A, Krieg V, et al. Can immunohistochemical markers and mitotic rate improve prognostic precision in patients with primary melanoma? *Cancer* 1999; 85: 2391-9.
 300. Van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 1998; 51: 716-724.
 301. Niemann TH, Argenyi ZB. Immunohistochemical study of Spitz nevi and malignant melanoma with use of antibody to proliferating cell nuclear antigen. *Am J Dermatopathol* 1993; 15: 441- 445.
 302. Georgieva J, Sinha P, Schadenhorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 2001; 54: 229- 235.
 303. Florennes VA, Faye RS, Maelandsmo GM, Nesland JM, Holm R. Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3614- 3620.
 304. Florennes VA, Maelandsmo GM, Nesland JM, Holm R. Cyclin A expression in superficial spreading malignant melanomas correlates with clinical outcome. *J Pathol* 2001; 195: 530- 536.
 305. Oyama T, Kashiwabara K, Yoshimoto K, Arnold A, Koerner F. Frequent overexpression of the cyclin D1 oncogene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Cancer Res* 1998; 58: 2876- 2880.
 306. Bartkova J, Lukas J, Goldberg P, et al. The p16-cyclin D/ Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. *Cancer Res* 1996; 56: 5475- 5483.
 307. Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995; 55: 2713- 2718.
 308. Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1845- 1853.
 309. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701- 704.
 310. Trotter MJ, Tang L, Tron VA. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1/CIP1) in human cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1997; 24: 265- 271.
 311. Florennes VA, Maelandsmo GM, Kerbel RS, Slingerland JM, Nesland JM, Holm R. Protein expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in malignant melanoma: inverse correlation with disease-free survival. *Am J Pathol* 1998; 153: 305- 312.
 312. Levine AJ, Chang A, Dittmer D, et al. The p53 tumor suppressor gene. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 817- 823.
 313. Korabiowska M, Brinck U, Hoenig JF, et al. Significance of p53 antigen in malignant melanoma and naevi of the head and neck area. *Anticancer Res* 1995; 15: 885- 889.
 314. Korabiowska M, Betke H, Kellner S, Stachura J, Schauer A. Differential expression of growth arrest, DNA damage genes and tumour suppressor gene p53 in naevi and malignant melanoma. *Anticancer Res* 1997; 17: 3697- 3700.
 315. Polsky D, Bastian BC, Hazan C, et al. HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2001; 61: 7642- 7646.
-

316. Zhang XD, Hersey P. Expression of catenins and p120cas in melanocytic nevi and cutaneous melanoma: deficient alpha-catenin expression is associated with melanoma progression. *Pathology* 1999; 31: 239- 246.
317. Demunter A, Libbrecht L, Degreef H, Wolf-Peeters C, van der Oord JJ. Loss of membranous expression of beta-catenin is associated with tumour progression in cutaneous melanoma and rarely caused by exon 3 mutations. *Mod Pathol* 2002; 15: 454- 461.
318. Tang A, Eller MS, Hara M, Yara M, Hirohashi S, Gilchrist BA. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci* 1994; 107: 983- 992.
319. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996; 1: 188-194.
320. Danen EH, van Muijen GN, Ruiter DJ. Role of integrins as signal transducing cell adhesion molecules in human cutaneous melanoma. *Cancer Surv* 1995; 24: 43-65.
321. Danen EH, Ten Berge PJ, van Muijen GN, Van't Hof-Grootenboer AE, Brocker EB, Ruiter DJ. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology* 1994; 24: 249-256.
322. Albelda SM, Mette SA, Elder DE, et al. Integrin distribution in malignant melanoma association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 1990; 50: 6757-6764.
323. Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer metastasis Rev* 1999; 18: 345-357.
324. Denton KJ, Stretch JR, Gatter KC, Harris AL. A study of adhesion molecules as markers of progression in malignant melanoma. *J Pathol* 1992; 167: 187-191.
325. Kageshita T, Yoshii A, Kimura T, et al. Biochemical and immunohistochemical analysis of cathepsin B, H, L and D in human melanocytic tumours. *Arch Dermatol Res* 1995; 287: 266- 272.
326. Frohlich E, Schlagenhaupt B, Mohrle M, Weber E, Klessen C, Rassner G. Activity, expression and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 2001; 91: 972- 982.
327. Hubert MA, Kraut N, Park JE, et al. Fibroblast activation protein: differential expression and serine protease activity in reactive stromal fibroblasts of melanocytic skin tumours. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 182- 188.
328. Baldi A, Santini D, Russo P, et al. Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. *Exp Dermatol* 2004; 13: 93-7.
329. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. Induction, regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35: 35- 70.
330. Zelger B, Hittmair A, Schir M, et al. Immunohistochemically demonstrated metallothionein expression in malignant melanoma. *Histopathology* 1993; 23: 257- 263.
331. Touab M, Villena J, Barranco C, Arumi-Uria M, Bassols A. Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol* 2002; 160: 549- 557.
332. Koganehira Y, Takeoka M, Ehara T, et al. Reduced expression of actin-binding proteins, h-caldesmon and calponin h1 in the vascular smooth muscle incide melanoma lesions: an adverse prognostic factor for malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2003; 148: 971- 980.
333. Swerdlow AJ, English J, MacKie RM, O'Doherty CJ, Hunter JAA, Clark J. Benign naevi associated with high risk of melanoma. *Lancet* 1984; 2: 168.
334. Swerdlow AJ, English J, McKie RM, O'Doherty C, Hunter JA, Clark J, Hole DJ. Benign melanocytic naevi as a risk factor for malignant melanoma. *Br Med J* 1986; 292: 1555- 1559.
335. Beral V, Evans S, Shaw H, Milton G. Cutaneous factors related to the risk of malignant melanoma. *Br J Dermatol* 1983; 109: 165- 172.

-
336. Grulich AE, Bataille V, Swerdlow AJ, Newton-Bishop JA, Cuzick J, Hersey P, McCarthy WH. Naevi and pigmentary characteristics as risk factors for melanoma in a high-risk population: a case-control study in New South Wales, Australia. *Int J Cancer* 1996; 67: 485- 491.
337. Osterlind A, Tucker MA, Hou-Jensen K, Stone BJ, Engholm G, Jensen OM. The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. Importance of host factors. *Int J Cancer* 1988; 42: 200- 206.
338. Garbe C, Kruger S, Stadler R, Guggenmoos-Holzmann I, Orfanos CE. Markers and relative risk in a German population for developing malignant melanoma. *Int J Dermatol* 1989; 28: 517- 523.
339. Holly EA, Keely JW, Shipall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17: 459- 468.
340. Grob JJ, Gouvernet J, Aymar D, Mostaque A, Romano MH, Collet AM, Noe MC, Diconstanzo MP, Bonerandi JJ. Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for non-familial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer* 1990; 66: 387- 395.
341. Evans RD, Kopf AW, Lew RA, et al. Risk factors for the development of malignant melanoma: Review of case-control studies. *J Dermatol Surg Oncol* 1988; 14: 393- 408.
342. Halpern AC, Guerry D, Elder DE, et al. A cohort study of melanoma in patients with dysplastic nevi. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 346S- 349S.
343. Nelly JW, Yeatman JM, Regalia G, et al. A high incidence of melanoma found in patients with multiple dysplastic naevi by photographic surveillance. *Med J Aust* 1997; 100: 346S- 349S.
344. Wang SQ, Kopf AW, Koenig K, et al. Detection of melanomas in patients followed up with total cutaneous examinations, total cutaneous photography, and dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50: 15- 20.
345. Garbe C, Buttner P, Weiss J, et al. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the central malignant melanoma registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 695.
346. Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, et al. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of nevi: a case-control study. *Br J Cancer* 1996; 73: 1605.
347. Tucker MA, Halpern A, Holly EA, et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* 1997; 277: 1439.
348. Titus-Ernstoff L, Duray PH, Ernstoff MS, et al. Dysplastic nevi in association with multiple primary melanoma. *Cancer Res* 1988; 48: 1016.
349. Piepkorn M, Meyer LJ, Goldgar D, et al. The dysplastic melanocytic nevus: a prevalent lesion that correlates poorly with clinical phenotype. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 407.
350. Roush GC, Dubin N, Barnhill RL. Prediction of histologic melanocytic dysplasia from clinical observation. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 555.
351. Elder DE, Xu X. The approach to the patient with a difficult melanocytic lesion. *Pathology* 2004; 36: 428- 34.
352. Shea CR, Prieto VG. Recent developments in the pathology of melanocytic neoplasia. *Dermatol Clin* 1999; 17: 615- 30.
353. Kim JC, Murphy GF. Dysplastic melanocytic nevi and pronostically indeterminate nevocmelanomatoid proliferations. *Clin Lab Med* 2000; 20: 691- 712.
354. Carli P, Urso C, De Giorgi V, et al. Sensitivity and specificity of clinical criteria in the detection of histological atypia. *Eur J Dermatol* 1994; 4: 35- 39.
355. Piepkorn M. A hypothesis incorporating the histologic characteristics of dysplastic nevi into the normal biological development of melanocytic nevi. *Arch Dermatol* 1990; 126: 514.
356. Hendrickson MR, Ross JC. Neoplasms arising in congenital giant nevi: morphologic study of seven cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1981; 5: 109-135.
-

357. de Vooght A, Vanwijck R, Gosseye S, Bayet B. Pseudotumoral proliferative nodule in a giant congenital nevus. *Br J Plast Surg* 2003; 56: 164- 167.
358. Herroon MD, Vanderhooft SL, Smock H, Zhou H, Leachman SA, Coffin C. Proliferative nodules in congenital melanocytic nevi. A clinicopathologic and immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 1017- 1025.
359. Mancianti ML, Clark WH, Hayes FA, et al. Malignant melanoma simulants arising in congenital melanocytic nevi do not show experimental evidence for a malignant phenotype. *Am J Pathol* 1990; 136: 817- 829.
360. Bastian BC, Xiong J, Frieden IJ, et al. Genetic changes in neoplasms arising in congenital melanocytic nevi. Differences between nodular proliferations and melanomas. *Am J Pathol* 2002; 161: 1163- 1169.
361. Busam K, Barnhill RL. In: Barnhill RL, ed. *Pathology of Melanocytic Nevi and malignant Melanoma*. Boston: Butterworth Heineman, 1995.
362. de Wit NJW, van Muijen GNP, Ruiter DJ. Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions. *Histopathology* 2004, 44: 517-541.
363. Isobe T, Ishioka N, Okuyama T. Structural relation of two S-100 proteins in bovine brain; subunit composition of S-100 protein. *Eur J Biochem* 1981; 115: 469-74.
364. Vanstapel MJ, Gatter KC, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Desmet VD. New sites of human S-100 immunoreactivity detected with monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol* 1986; 85: 160-8.
365. Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Kameya T, Hirota T, Shimosato Y. An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 715-27.
366. Chen YT, Stocker E, Jungbluth A, Tsang S, Coplan KA, Scanlan MJ, et al. Serological analysis of Melan -A (MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 5915-9.
367. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Schneider J, Traversari C, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1994; 180: 35-42.
368. Busam KJ, Chen YT, Old LJ, Stockert E, Iversen K BA, Coplan KA, Rosai J, Barnhill R, Jungbluth AA. Expression of Melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 976-982.
369. Jungbluth AA, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Chen YT, Stockert T, et al. Expression of melanocyte-associated markers gp-100 and Melan-A/MART-1 in angiomyolipomas. *Virchows Arch* 1999; 434: 429-435.
370. Busam KJ. Cutaneous desmoplastic melanoma. *Adv Anat Pathol* 2005; 12: 92-102.
371. Kapur RP, Bigler SA, Skelly M, Gown AM. Anti-melanoma monoclonal antibody HMB45 identifies an oncofetal glycoconjugate associated with immature melanosomes. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 207.
372. Skelton HG, Smith KJ, Barrett TL, Lupton GP, Graham JH. HMB-45 staining in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 1991; 13: 543.
373. Kornstein MJ, Franco AP. Specificity of HMB-45. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114:450.
374. Bruns RR, Palade GE. Studies on blood capillaries I. General organization of blood capillaries in muscle. *JCell Biol* 1968; 37: 244-76.
375. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, EngelmanJA, Scherer PE, et al. Caveolins, ordered lipid domains and signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999;19: 7289-304.
376. Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 1992; 255: 410-1.
377. Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kübler E, Song KS, Sanders M, et al. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9407-11.
378. Koleske AJ, Baltimore D, Lisanti MP. Reduction of caveolina and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995. 92: 1381-1385.

-
379. Nakashima H, Hamamura K, Houjou T, Taguchi R, et al. Overexpression of caveolin-1 in a human melanoma cell-line results in dispersion of ganglioside GD3 from lipid rafts and alteration of leading edges, leading to attenuation of malignant properties. *Cancer Sci* 2007; 98 (4): 512- 520.
380. Iwabuchi K, Handa K, Hakomori S. Separation of "Glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrana fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. *J Biol Chem* 1998; 273 (50): 33766- 33773.
381. Liu J, Lee P, Galbati F, Kitsis RN, Lisanti MP. Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C823- C835.
382. Jun L, Razani B, Shaoqing T, Terman BI, Ware JA, Lisanti MP. Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 15781- 15785.
383. Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T, Lisanti MP. Recombinant Expression of caveolin-1 in oncogenically cells abrogates anchorage- independent growth. *J Biol Chem* 1997; 272 (26): 16374- 16381.
384. Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galphasubunits, and H-Ras share a common membrane-associated scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996; 271: 29182-90.
385. Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 1997; 272: 18522-5.
386. Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/ threonine kinase activities. *J Biol Chem* 1997; 272: 30429-38.
387. Okamoto T, Schlegels A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998; 273: 5419-22.
388. Engelman JA, Chu C, Lin A, Jo H, Ikezu T, Okamoto T, et al. Caveolin-mediated regulation of signalling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin scaffolding domain. *FEBS Lett* 1998; 428: 205-11.
389. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff A-K. Integrin signaling in malignant melanoma. *Canc Metast Rev* 2005; 24: 195- 222.
390. Wary KK, Mariotti, Zurzolo C, Giancotti FG. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 1998; 94: 625- 634.
391. Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol* 2002; 33:484-95.
392. Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K et al. preferential localization of c-kit product in tissue mast cell, basal cell of the skin, epithelial cell of breast, small cell lung carcinoma, and seminoma/ dysgerminoma in humans: immunohistochemical study of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch* 1994; 424:131-41.
393. Maeda H, Yamagata S, Nishikawa S, et al. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 1992; 116:369-74.
394. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor c-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31:1037-51.
395. Grichnik JM. Kit and melanocyte migration. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 945-947.
396. Alexeev V, Yoon K. Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1102-1110.
397. Grichnik JM, Burch JA, Burchette J, Shea CR. The Scf/KIT pathway plays a critical role in the control of normal human melanocyte homeostasis. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 233-238.
398. Stefanou D, Batistatou A, Zioga A, et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and c-kit in cutaneous melanocytic lesions. *Int J Surg Pathol* 2004; 12: 133-138.
399. Giehl KA, Nägele U, Volkenandt M, Berking C. Protein expression of melanocyte growth factors (bFGF, SCF) and their receptors (FGFR-1, c-kit) in nevi and melanoma. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 7-14.
-

400. Shen SS, Zhang PS, Eton O, Prieto VG. Analysis of protein tyrosin kinase in melanocytic lesions by tissue array. *J Cutan Pathol* 2003; 30: 539-47.
401. Zhu YI, Fitzpatrick JE. Expression of c-kit (CD117) in Spitz nevus and malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 2006; 33: 33-37.
402. Lassam N, Bickford S. Loss of c-kit expression in cultured melanoma-cells. *Oncogene* 1992; 7: 51- 56.
403. Natali PG, Nicotra MR, Winkler AB, et al. Progression of human cutaneous melanoma in associated with loss of expression of c-kit protooncogene receptor. *Int J Cancer* 1992; 52: 197- 201.
404. Zakut R, Perlis R, Eliyahu S, et al. Kit-ligand (mast-cell growth-factor) inhibits the growth of kit expressing cells. *Oncogene* 1993; 8: 2221- 2229.
405. Huang SY, Luca M, Gutman M, et al. Enforced c-kit expresión renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to item cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potencial. *Oncogene* 1996; 13: 2339- 2347.
406. Montone KT, von Belle P, Elenitsas R, et al. Proto-oncogene c-kit expresión in malignant melanoma: protein loss with tumor progresión. *Mod Pathol* 1997; 10: 939- 944.
407. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4340- 4346.
408. Isozaki K, Terris B, Belghiti J, et al. Germline-activating mutation in the kinase domain of KIT gene in familial gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000; 156: 791- 795.
409. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelomatous leukaemia. *N Engl J Med* 2002; 346: 645- 652.
410. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002; 347: 472- 480.
411. Heinrich MC, Corless CL, Blanke C, et al. KIT mutational status predicts clinical response to STI571 in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: 2a.
412. Went P, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, et al. Prevalence of KIT expression in human tumours. *J Clin Oncol* 2004; 22 (22): 4514- 4522.
413. Becker JC, Bröcker EB, Schadenhorf D, Ugurel S. Imatinib in melanoma: a selective treatment option based on KIT mutation status?. *J Clin Oncol* 2007; 25: e9.
414. Collins K, Jacks T, Pavletich N. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2776- 2778.
415. Coqueret O. Linking Cyclins to transcriptional control. *Gene* 2002; 299: 35-55.
416. Smits VAJ, Medema RH. Cecking out the G2/m transition. *Bioch Bioph Acta* 2001; 1519: 1- 12.
417. Gartel AL, Shchors K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* 2003; 283: 17- 21.
418. Grinstein E, Jundt F, Weinert I, Wernet P, Royer HD. Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21 (10): 1485- 92.
419. Gladden AB, Diehl JA. Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. *J Cell Biochem* 2005; 96: 906- 913.
420. Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 2000; 14: 2393- 2409.
421. Huang X, Hatcher R, York JP, Zhang P. Securin and separase phosphorylation act redundantly to maintain sister chromatid cohesion in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4725-32.
422. Lane DP. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
423. Lane DP, Lu X, Hupp T, Hall PA. The role of the protein in the apoptotic response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 345: 277-80.

-
424. Motokura T, Arnold A. PRAD 1/cyclin D1 proto-oncogen: genomic organization, 5' DNA sequence, and sequence of a tumor-specific rearrangement breakpoint. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 7: 89-95.
425. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, et al. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell-cycle. *Cell* 1991; 65: 701- 713.
426. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 2006; 25: 1620- 1628.
427. Bosch F, Jares P, campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, et al. *Blood* 1994; 84: 2726- 2732.
428. Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, Sini RL, et al. Expresión and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* 1993; 8: 2127- 2133.
429. Gillett C, Fantl V, Smith R, et al. *Cancer Res* 1994; 54: 1812- 1817.
430. Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 2001; 54: 229-35.
431. Florenes VA, Faye RS, Maclandsmo GM, et al. Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3614- 20.
432. Ramirez JA, Guitart J, Rao S, Diaz LK. Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. *Ann Diag Pathol* 2005; 9: 185- 188.
433. Inohara S, Kitagawa K, Kitano Y. expression of cyclin D1 and p53 protein in various malignant skin tumors. *Dermatology* 1996; 192: 94-8.
434. Ewanowich C, Brynes RK, Medeiros LJ, McCourty A, Lai R. Cyclin D1 expression in dysplastic nevi: an immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 208-210.
435. Nagasaka T, Lai R, Medeiros LJ, Brynes R, McCourty A, Harada T, Saddik M. Cyclin D1 overexpression in Spitz nevi: an immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol* 1999; 21: 115-120.
436. Bergman W, Ruitter DJ, Scheffer E, van Vloten WA, Melanocytic atypia in dysplastic nevi: immunohistochemical and cytophotometrical analysis. *Cancer* 1988; 61:1660-1666.
437. Schmidt B, Weinberg DS, Hollister K, Barnhill RL. Analysis of melanocytic lesion by DNA image cytometry. *Cancer* 1994; 2971-2977.
438. Elder DE, Clark, WH Jr, Elenitas R, Guerry D 4th, Halpern AC. The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic nevi). *Semin Diagn Pathol* 1993; 1: 18-35.
439. Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4, and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 66: 72-74.
440. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602: 73-87.
441. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol* 2003; 163: 1765- 1770.
442. Muthusamy V, Hobbs C, Nogueira C, et al. Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 447-454.
443. Hayward NK. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* 2003; 22: 3053-3062.
444. Smalley KSM, Contractor R, Nguyen T, et al. Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin dependent kinase-4 overexpression. *Cancer Res* 2008; 68: 5743-52.
445. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-1512.
446. Serrano M, Hannon GJ, McCurrach ME, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704-7.
-

447. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-Ink4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 667-77.
448. Cammett TJ, Luo L, Peng Z. Design and characterization of a hyperstable p16INK4a that restores CDK4 binding activity when combined with oncogenic mutations. *J Mol Biol* 2003; 327: 285-297.
449. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997; 237: 7-13.
450. Sini MC, Cossu MA, Budroni M, et al. Molecular alterations at chromosome 9p21 in melanocytic naevi and melanoma. *Br J Dermatol* 2008; 158: 243-250.
451. Gray Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, et al. Cellular senescence in naevi and immortalization in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 2006; 95: 496-505.
452. Keller-Melchior R, Schimdt R, Piepkorn M. Expression of the tumor Suppressor gene product p16INK4 in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 932-938.
453. Sparrow LE, Eldon MJ. p16 and p21 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol* 1998; 20: 255- 261.
454. Child ES, Mann DJ. The intricacies of p21 phosphorylation. Protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* 2006; 5: 1313-1319.
455. Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in Transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 2005; 65: 3980-5.
456. Maelandsmo GM, Holm R, Fodstad O, Kerbel RS, Florenes VA. Cyclin kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 in malignant melanoma. Reduced expresión in metastatic lesions. *Am J Payhol* 1996; 149:1816-1822.
457. Kapur P, Selim MA, Roy LC, Yegappan M, Weinberg AG, Hoang MP. Spitz nevi and atypical Spitz nevi/tumors: a histologic and immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 2005; 18: 197-204.
458. Maldonado JL, Timmerman L, Fridlyand J, Bastian BC. Mechanisms of cell-cycle arrest in Spitz nevi with constitutive activation of MAP-kinase pathway. *Am J Pathol* 2004; 164: 1783-1787.
459. Fernández Gómez FJ, Gómez-Lázaro M, Jordán J. p53, nuestro guardian, celebra sus bodas de plata. *Actualidad m farmacología y terapéutica* 2004; 2: 195-203.
460. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57:1083-1093.
461. Hussein MR. The TP53 tumor suppressor gene and melanoma tumorigenesis: is there a relationship? *Tumor Biol* 2004; 25: 200-207.
462. Kaleem Z, Lind AC, Humphrey PA, Sueper RH, Swanson PE, Ritter JH, Wick MR . Concurrent Ki-67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms. An adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanomas? *Mod Pathol* 2000; 13: 217-222.
463. Cristofolini M, Boi S, Girlando S, Zumiani G, Cristofolini P, Dalla Palma P, Doglioni C, Barbareschi M. p53 Protein expression in nevi and melanomas. *Arch Dermatol* 1993; 129: 739-43.
464. Albino AP, Vidal MJ, McNutt NS, Shea CR, Prieto VG, Nanus DM, Palmer JM, Hayward NK. Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res* 1994; 4: 35-45.
465. Lassam NJ, From L, Kahn HJ. Overexpression of p53 is a late event in the development of malignant melanoma. *Cancer Res* 1993; 53:2235-2238.
466. McGregor JM, Yu CC, Dublin EA, Barnes DM, Levison DA, MacDonald DM. P53 immunoreactivity in human malignant melanoma and dysplastic nevi, *Br J Dermatol* 1993; 128: 606-611.
467. Weiss J, Heine M, Körner B, Pilch H, Jung EG, Expression of p53 protein in malignant melanoma: clinicopathological and prognostic implications. *Br J Dermatol* 1995; 133: 23-31.
468. Florenes VA, Holm R, Fodstad O. Accumulation of p53 protein in human malignant melanoma. Relationship to clinical outcome. *Melanoma Res* 1995; 5: 183-7.

-
469. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: From molecular biology to clinical investigation. *Ann NY Acad Sci* 2000; 910: 121: 37; discussion 37-39.
470. Sparrow LE, Soong R, Dawkins HJ, Iacopetta BJ, Heenan PJ. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 1995;5:93-100.
471. Rodríguez-Cruz M, del Prado M, Salcedo M. Perspectivas en la genómica del retinoblastoma: implicaciones del gen supresor de tumor RB1. *Revista de Investigación Clínica* 2005; 57: 572-581.
472. Herwig S, Strauss M. The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur J Biochem* 1997; 246: 581-601.
473. Paggi MG, Baldi A, Bonetto F, Giordano A. Retinoblastoma Protein Family in cell cycle and cancer: a review. *J Cell Biochem* 1996; 62: 418-430.
474. Korabiowska M, Ruschenburg I, Betke H, et al. Downregulation of the retinoblastoma gene expression in the progression of malignant melanoma. *Pathobiology* 2001; 69: 274-280.
475. Maelandsmo GM, Florenes VA, Hovig E, et al. Involvement of the pRb/p16/cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanoma. *Br J Cancer* 1996; 73: 909-916.
476. Saenz-Santamaria MC, McNutt NS, Shea CR. Immunohistochemical expression of retinoblastoma protein in cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 1995; 133: 890-895.
477. Roesch A, Becker B, Meyer S, et al. Overexpression and hyperphosphorylation of retinoblastoma protein in the progression of malignant melanoma. *Mod Pathol* 2005; 18: 565-572.
478. Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett* 2007; 249: 49-60.
479. Sah NK, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett* 2006; 244: 164-171.
480. Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara J, Okuda J, Watanabe I, et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis during human colorectal carcinogenesis. *Cancer* 2001; 91: 2026-2032.
481. Ding Y, Prieto VG, Zhang PS. Nuclear Expression of the antiapoptotic protein survivin in malignant melanoma. *Cancer* 2006; 106: 1123-1129.
482. Nasr MR, El-Zammar O. Comparison of pHH3, Ki-67 and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2008; 30:117-122.
483. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; 22: 8581-8589.
484. Piras F, Murtas D, Minerba L, et al. Nuclear survivin is associated with disease recurrence and poor survival in patients with cutaneous malignant melanoma. *Histopathology* 2007; 50: 835-842.
485. Suzuki A, Hayashida M, Ito T, et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with CDK4/p16 (INK4) y CDK2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000; 19: 3225-3234.
486. Florell SR, Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Grossman D. Proliferation, apoptosis and survivin expression in a spectrum of melanocytic nevi. *J Cutan Pathol* 2005; 32: 45-49.
487. Alanko T, Rosemberg M, Saksela O. FGF expression allows nevus cell to survive in three dimensional collagen gel under conditions that induce apoptosis in normal human melanocytes. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 111.
488. Bowen AR, Hanks AN, Allen SM, et al. Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 48.
489. Gerdes J, Schlueter C, Duchrow M, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J pathol* 1991; 138: 867- 873.
490. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002; 40: 2-11.
491. Roa S JC. Marcadores moleculares: proliferación celular e inestabilidad microsatelital. *Gastr Latinoam* 2003; 14: 195-199.
-

492. Chorny JA, Barr RJ, Kyshtobayeva A, Jakowatz J. Ki-67 and p53 expression in minimal deviation melanomas as compared with other nevocytic lesions. *Mod Pathol* 2003; 16: 525-529.
493. McNutt SN, Urmacher C, Hakimian J, Hoss DM, Lugo J. Nevroid malignant melanoma: morphologic patterns and immunohistochemical reactivity. *J Cutan Pathol* 1995; 22: 502-17.
494. Kaleem Z, Lind AC, Humphrey PA, Sueper RH, Swanson PE, Ritter JH, et al. Concurrent Ki 67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms: an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanomas? *Mod Pathol* 2000; 13: 217-22.
495. Vereecken P, Laporte M, Heenen M. Significance of cell kinetic parameters in the prognosis of malignant melanoma: a review. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 139-145.
496. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-6.
497. Jiricny J. Replication errors: challenging the genome. *The EMBO Journal* 1998; 17 (22): 6427- 6436.
498. Marra G, Schär P. Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem J* 1999; 338: 1- 13.
499. Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 101- 133.
500. Kolodner RD. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev* 1996; 10: 1433- 1442.
501. Duval A, Hamelin R. Réparation des erreurs de réplication, microsatellites et cancer. *Med Sci* 2003 ; 19 (1) : 55- 62.
502. Hughes MJ, Jiricny J. The purification of a human mismatch-binding protein and identification of its associated ATPase and helicase activities. *J Biol Chem* 1992; 267: 23876-82.
503. Guerrette S, Acharya S, Fishel R. The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *J Biol Chem* 1999; 274: 6336- 41.
504. Prolla TA, Christie DM, Liskay RM. Dual requirement in yeast DNA mismatch repair for MLH1 and PMS1, two homologues of the bacterial mutL gene. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 407- 15.
505. Wagner R, Meselson M. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 4135-9.
506. Blackwell LJ, Bjornson KP, Modrich P. DNA-dependent activation of hMutSalpha ATPase. *J Biol Chem* 1998; 273: 3969-74.
507. Tran HT, Gordenin DA, Resnick MA. The 3'-5' exonucleases of DNA polymerases delta and epsilon and the 5'-3' exonuclease ExoI have major roles in postreplication mutation avoidance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2000-7.
508. Modrich P. Strand specific mismatch repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 24727- 30.
509. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104: 1535- 49.
510. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue h MLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 258- 61.
511. Papadopoulos N, Nicolaïdes NC, Wei YF, et al. Mutation of a MutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; 263: 1625-9.
512. Leach FS, Nicolaïdes NC, Papadopoulos N, et al. Mutation of a MutS homolog in hereditary non polyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75: 1215- 25.
513. Nicolaïdes NC, Papadopoulos N, Liu B, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary non polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 371: 75-80.
514. Lynch HT, Smyrk T, Lynch J. An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93: 84- 99.
515. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaïdes NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 169- 174.
516. Casares S, Ionov Y, Ge HY, Stanbridge E, Perucho M. The microsatellite mutator phenotype of colon cancer cells is often recessive. *Oncogene* 1995; 11: 2303- 10.

-
517. Wilson TM, Ewel A, Duguid IR Eble J.N., Lescoe M.K, et al. Differential cellular expression of the human MSH2 repair enzyme in small and large intestine. *Cancer Res* 1995; 55:5146-50.
518. Thibodeau S.N, French AJ, Roche P.C., Cunningham J.M., Tester D.J. et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996; 56:4836-40.
519. Marcus V.A., Madlenski L., Gryfe R., KimH, So K, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatches repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:1248-55.
520. de Leeuw W.J., Dierssen J, Vasen H.F., Wij-nen J.T., Kenter G.G. et al, Prediction of a mismatch repair gene defect by microsatellite instability and immunohistochemical analysis in endometrial tumors from HNPCC patients. *J Pathol* 2000; 192:328-35.
521. Saalahshor S, Koelble K, Rubio C, Lind-blom A. Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest* 2001; 81:535-41.
522. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E, Lagerstedt K, Nilbert, M. Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary non polyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444: 135-41.
523. Lahue RS, Au KG, Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. *Science* 1989; 245: 160-4.
524. Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R, Sidransky D, Eshleman J.R., et al. A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *Cancer Res* 1998; 58:5248-57.
525. Alvino E, Marra G, Pagani E, Falcinelli S, et al. High-frequency microsatellite instability is associated with defective DNA mismatch repair in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 79-86.
526. Hussein MR, Sun M, Tuthill RJ, Roggero E, Monti JA, et al. Comprehensive analysis of 112 melanocytic skin lesions demonstrates microsatellite instability in melanomas and dysplastic nevi, but not in benign nevi. *J Cutan Pathol* 2001; 28: 343- 350.
527. Hussein MR, Roggero E, Sudilovsky EC, Tuthill RJ, et al. Alterations of mismatch repair protein expression in benign melanocytic dysplastic nevi and cutaneous malignant melanomas. *Am J Dermatopathol* 2001; 23(4): 308- 314.
528. Birindelli S, Tragni G, Bartoli C, et al. Detection of microsatellite alterations in the spectrum of melanocytic nevi in patients with or without individual or family history of melanoma. *Int J Cancer* 2000; 86: 255- 61.
529. Korabiowska M, Cordon-Cardo C, Jaenckel F, et al. Application of in-situ hybridization probes for MLH-1 and MSH-2 in tissue-microarrays of paraffin-embedded malignant melanomas: correlation with immunohistochemistry and tumor stage. *Hum Pathol* 2004; 35: 1543-1548.
530. Peris K, Keller G, Chimenti S, et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in melanoma. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 625-8.
531. Quinn AG, Healy E, Rehman I, et al. Microsatellite instability in human non-melanoma and melanoma skin-cancer. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 309- 12.
532. Richetta A, Silipo V, Calvieri S, et al. Microsatellite instability in primary and metastatic melanoma [Letter]. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 119- 20.
533. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, et al. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 159-64.
534. Hussein MR. Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 797-801.
535. Shin K, Park J. Microsatellite instability is associated with genetic alteration but not with low levels of expression of the human mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1. *Eur J Cancer* 2000; 36: 925-31.
536. Jass JR, Do KA, Simms LA, et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998; 42: 673- 679.
537. Jass JR, Biden KG, Cummings MC, et al. Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 1999; 52: 455- 460.
-

538. Lage H, Christmann M, Kern MA, et al. Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance. *Int J Cancer* 1999; 80: 744-50.
539. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 1996; 56: 159-64.
540. Adams CL, Nelson WJ, Smith SJ. Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1996; 135: 1899-1911.
541. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 2002; 109: 987-91.
542. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 237-52.
543. Shapiro L, Fannon AM, Kwong A, et al. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 1995; 374: 327-37.
544. Peyrieras N, Hyafil F, Louvard D, Ploegh HL, Jacob F. Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80(20): 6274-7.
545. Hyafil F, Morello D, Babinet C. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell* 1980; 21: 927-34.
546. Yap AS, Briecher WM, Pruschy M, Gumbiner BM. Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol* 1997; 7: 308-315.
547. Briecher WM, Yap AS, Gumbiner BM. Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J Cell Biol* 1992; 3: 149-155.
548. Vlemminckx K, Kemler R. Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays* 1999; 21: 211-220.
549. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103: 311-20.
550. Haass NK, Smalley KSM, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment cell Res* 2005; 18: 150-159.
551. Haass NK, Smalley KSM, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol* 2004; 35: 309-318.
552. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 46-54.
553. Cavallaro U, Christofori G. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014: 58-66.
554. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014: 155-63.
555. Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett* 2002; 176: 123-8.
556. Knudsen KA, Wheelock MJ. Cadherins and the mammary gland. *J Cell Biochem* 2005; 95: 488-96.
557. Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S, Gilshesht BA. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci* 1994; 107: 983-992.
558. Krengel S, Grotelüschen F, Bartsch S, Tronnier. Cdherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the melanocyte environment than on tumor cell progression. *J cutan Pathol* 2004; 31: 1-7.
559. Sanders DSA, Blessing K, Hassan GAR, Bruton R, Jankowski J. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumors. *J Clin Pathol: Mod Pathol* 1999; 52: 151-157.
560. Cowley GP, Smith MEF. Cadherin expression in melanocytic naevi and malignant melanomas. *J Pathol* 1996; 179: 183-189.
561. Menke A, Phillipi C, Vogelmann R, et al. Down-regulation of E-cadherin gene expression by collagen type I and type III in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 2001; 61: 3508.

-
562. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998; 153: 333- 339.
563. Jones P, Laird P. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21: 163- 167.
564. Cano A, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 76- 83.
565. Hirano S, Kimoto N, Shimoyama Y, et al. Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell* 1992; 70: 293- 301.
566. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14: 1837- 1851.
567. Piedra J, et al. Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 2001; 276: 20436- 20443.
568. Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 2000; 156: 1515- 1525.
569. Andersen K, Nesland JM, Holm R, Florennes VA, Fodstad O, Maelandsmo GM. Expression of S100A4 combined with reduced E-cadherin expression predicts patient outcome in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2004; 17 :990-997.
570. Suyama K, Shapiro I, Guttman M, et al. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell* 2002; 3: 301- 14.
571. Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun* 1997; 4: 399- 411.
572. Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4386- 97.
573. Gang Li, Stayamoorthy, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 3819-1825.
574. Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* 2000; 19: 816- 827.
575. Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 1994; 8: 163- 173.
576. Porter PL, Sage EH, Lane TF, Funk SE, Gown AM. Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 791- 800.
577. Gilles C, Bassuk JA, Pulyaeva H, Sage EH, Foidart JM, Thompson EW. SPARC/osteonection induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell-lines. *Cancer Res* 1998; 58: 5529- 5536.
578. Jacob K, Webber M, Benayahu D, Kleinman HK. Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res* 1999; 59: 4453- 4457.
579. Golembieski WA, Ge S, Nelson K, Mikkelsen T, Rempel SA. Increased SPARC expression promotes U87 glioblastoma invasion in vitro. *Int J Dev Neurosci* 1999; 17: 463- 472.
580. Ledda F, Bravo AL, Adris S, Bover L, Mordoh J, Podhajcer OL. The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 210- 214.
581. Rempel SA, Ge S, Gutierrez JA. SPARC: a signal of astrocytic neoplastic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 237- 241.
582. Podhajcer OL, Wolf C, Lefebvre O, Segain JP, Rouyer N, Stoll I, Rio MC, Chambon P, Basset P. Comparative expression of the SPARC and stromelysin-3 in mammary tumours. *The breast* 1996; 5: 13- 20.
583. Porte H, Chastre I, Prevot S, Nordlinger B, Empereur S, Basset P, Chambon P, Gespach CH. Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *Int J Cancer* 1995; 64: 70- 75.
-

584. Sage EH, Vernon R, Funk S, Everitt E, Angello J. SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca^{2+} dependent binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989; 109: 341.
585. Funk SE, Sage EH. The Ca^{2+} binding glycoprotein SPARC modulates cell-cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2648- 2652.
586. Funk SE, Sage EH. Differential effects of SPARC and catininc SPARC peptides on DNA síntesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1993; 154: 53-63.
587. Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. Osteonectin Expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol* 1999; 30: 330-344.
588. Ikuta Y, Nakatsura T, Kageshita T, et al. Highly sensitive detection of melanoma at an early stage based on the increased serum secreted protein acidic and rich in cystein and glypican-3 levels. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8079-8088.
589. Ledda MF, Adris S, Bravo AI, Kairyama C, Bover L, Chernajovsky Y, Mordoh J, Podhajcer OL. Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med* 1997; 3: 171-176.
590. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible Structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 460- 465.
591. Chabas D. L'osteopontine, une molecule aux multiples facettes. *Med Sci* 2005; 21: 832- 8.
592. Sorensen ES, Petersen TE. Phosphorylation, glycosylation and transglutaminase sites in bovine osteopontin. *Ann NY Acad Sci* 1995 ; 21 : 363-6.
593. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin : a protein with diverse functions. *FASEB J* 1993 ; 7 : 1475-82.
594. Chambers AF, Wilson SM, Kerkvliet N, O'Malley FP, Harris JF, Casson AG. Osteopontin expression in lung cancer. *Lung Cancer* 1996; 15: 311–23.
595. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, et al. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998; 79: 502–8.
596. Casson AG, Wilson SM, McCart JA, et al. Ras mutation and expression of the ras-regulated genes osteopontin and cathepsin L in human esophageal cancer. *Int J Cancer* 1997; 72: 739–45.
597. Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, et al. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998; 79: 127–32.
598. Thalman GN, Sikes RA, Devoll RE, et al. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2271–7.
599. Saitoh Y, Kuratsu JI, Takeshima H, Yamamoto S, Ushio Y. Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy. *Lab Invest* 1995; 72: 53–5.
600. Oates AJ, Barraclough R, Rudland PS. The role of osteopontin in tumorigenesis and metastasis. *Invasion Metastasis* 1997; 17: 1–15.
601. Zhou Y, Dai DL, Martinka M, et al. Osteopontin expression correlates with melanoma invasion. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 1044- 1052.
602. Furger KA, Menon RK, Tuck AB, Bramwell VHC, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontina in cancer and metastasis. *Current Mol Med* 2001; 1: 621- 632.
603. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11: 279- 303.
604. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontina (Eta-1). *Science* 1996; 271: 509- 512.
605. Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, et al. CD44 variants cooperate with beta-1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 1999; 59: 219- 26.

-
606. Fujisaki T, Tanaka Y, Fujii K, Mine S, Saito K, Yamada S, Yamashita U, Irimura T, Eto S. CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins. *Cancer Res* 1999; 59: 4427- 34.
607. Webb CP, Taylor GA, Jeffers M, Fiscella M, Okarsson M, Resau JH, Vande Woude GF. Evidence for a role of Met-HGF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis. *Oncogene* 1998; 17: 2019- 25.
608. Trusolino L, Cavassa S, Angelini P, Andó M, et al. HGF/scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin activity. *FASEB J* 2000; 14: 1629- 40.
609. Yuck AB, Arsenault DM, O'Malley FP. Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells. *Oncogene* 1999; 18: 4237- 46.
610. Teti A, Farina AR, Villanova I, et al. Activation of MMP-2 by human GCT23 giant cell tumour cells induced by osteopontin, bone sialoprotein and GRGDSP peptides in RGD and cell shape change dependent. *Int J Cancer* 1998; 77: 82- 93.
611. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; 79: 1157- 64.
612. Liaw L, Lidner V, Schwartz SM. Et al. Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res* 1995; 77: 665-72.
613. Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, et al. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 1998; 141: 1083- 1093.
614. Denhardt DT, Chambers AF. Overcoming obstacles to metastasis-defenses against host defenses: osteopontin (OPN) as a shield against attack by cytotoxic host cells. *J Cell Biochem* 1994; 50: 48- 51.
615. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 1998; 152: 353-8.
616. Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Toug MF, Fisher LW. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem* 2000; 275 (22): 16666-72.
617. Philip S, Kundu GC. Osteopontin induces nuclear factor kappa B-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through I kappa B/IKK signaling pathways, and curcumin (diferulolymethane) downregulates these pathways. *J Biol Chem* 2003; 278: 14487-14497.
618. Sturm RA. Osteopontin in melanocytic lesions – a first step towards invasion? *J Invest Dermatol* 2005; 124: xiv-xvi.
619. Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B, et al. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol* 1994; 145: 610-23.
620. Rangel J, Nosrati M, Torabian S, et al. Osteopontin as a molecular prognostic marker for melanoma. *Cancer* 2008; 112: 144-50.
621. Gong M, Lu Z, Fang G, Bi J, Xue X. A small interfering RNA targeting osteopontin as gastric cancer therapeutics. *Cancer Lett* 2008; en prensa.
622. Winfield HL. Osteopontin expression in Spitz nevi. *Arch Dermatol* 2007; 143: 1076-1077.
623. Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 1993; 291: 329- 343.
624. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995; 9: 484- 496.
625. Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 2000; 19: 496- 503.
626. Baier G. The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions. *Immunol Rev* 2003; 192:64– 79.
627. Kolch W, Heidecker G, Kochs G, et al. Protein kinase Cα activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 1993; 364: 249–252.
628. Izquierdo M, Downward J, Graves JD and Cantrell DA. Role of protein kinase C in T-cell antigen receptor regulation of p21ras: evidence that two p21ras regulatory pathways coexist in T cells. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 3305–3312.
-

629. Downward J, Graves JD, Warne J, Rayter S, Cantrell DA. Stimulation of p21ras upon T-cell activation- Nature 1990; 346: 719–723.
630. Ruland J, Duncan GS, Elia A, et al. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF- κ B and neural tube closure, Cell 2001;104:33–42
631. Zeng X, Xu H, Glazer RI. Transformation of mammary epithelial cells by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is associated with the induction of protein kinase C α . Cancer Res 2002; 62:3538–3543.
632. Wang XY, Repasky E, Liu HT. Antisense inhibition of protein kinase C α reverses the transformed phenotype in human lung carcinoma cells, Exp Cell Res 1999; 250:253–263.
633. Oka M, Kageshita T, Ono T, Goto A, Kuroki T, Ichihashi M. Protein Kinase C α associates with phospholipase D1 and enhances basal phospholipase D activity in a protein phosphorylation-independent manner in human melanoma cells. J Invest Dermatol 2003; 121: 69-76.
634. Oka M, Nishigori C, Kageshita T, Hsu MY, Penmatcha S, Herlyn M. Expression of PKC isoforms in human melanocytic cells in situ.
635. Oka M, Kikawa U. Protein kinase C in melanoma. Cancer and metastasis Reviews 2005; 24: 287- 300.
636. Eisinger M, Marko O. selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 2018- 2022.
637. Buitrago CG, Pardo VG, de Boland AR, Boland R. Activation of RAF-1 through Ras and protein kinase C α mediates 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D3 regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in muscle cells. J Biol Chem 2003; 278: 2199–2205.
638. Coppock DL, Tansey JB, Nathanson L. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces transient cell cycle arrest in G1 and G2 in metastatic melanoma cells: Inhibition of phosphorylation of p34cdc2. Cell Growth Differ 1992; 3: 485-492.
639. Krasagakis K, Lindshau C, Fimmel S, et al. Proliferation of human melanoma cells is under tight control of protein kinase C α . J Cell Physiol 2004; 199: 381-387.
640. Frey MR, Clark JA, Leontieva O, et al. Protein kinase C signaling mediates a program of cell cycle withdrawal in the intestinal epithelium, J Cell Biol 2000; 151: 763–778.
641. Detjen KM, Brembeck FH, Welzel M, et al. Activation of protein kinase C α inhibits growth of pancreatic cancer cells via p21cip-mediated G1 arrest. J Cell Sci 2000; 113: 3025–3035.
642. Timar J, Toth S, Tovari J, Paku S, Raz A. Autocrine motility factor (neuroleukin, phosphohexose isomerase) induces cell movement through 12-lipoxygenase-dependent tyrosine phosphorylation and serine dephosphorylation events. Clin Exp Metastasis 1999; 17: 809-816.
643. Mapelli E, Banfi P, Sala E, et al. Effect of protein C inhibitors on invasiveness of human melanoma clones expressing different levels of protein kinase C isoenzymes. Int J Cancer 1994; 57: 281-286.
644. Liu B, Khan WA, Hannun YA, et al. 12 (s)-hydroxyeicosatetraenoic acid and 13 (s)-hydroxyoctadecadienoic acid regulation of protein-kinase C α in melanoma cells: Role of receptor mediated hydrolysis of inositol phospholipids. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 9323-9327.
645. Holinstat M, Mehta D, Kozasa T, et al. Protein kinase C α -induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement, J Biol Chem 2003; 278: 28793–28798.
646. Anilkumar N, Parsons M, Monk R, et al. Interaction of fascin and protein kinase C α : a novel intersection in cell adhesion and motility, EMBO J 2003; 22: 5390–5402.
647. Weeraratna AT, Jiang Y, Hostteter G. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. Cancer cell 2002; 1: 279-288.
648. Gopalakrishna R, Barsky SH. Tumor-promoter induced membrane-bound protein kinase C regulates hematogenous metastasis. Proc Natl Acad Sci USA. Biochem Biophys Res Commun 1994; 204:264-272.
649. Dennis JU, Dean NM, Bennett CF, Griffith JW, Lang CM, Welch DR. Human melanoma metastasis is inhibited following ex vivo treatment with an antisense oligonucleotide to protein-kinase C- α . Cancer Lett 1998; 128: 65-70.

-
650. La Porta CAM, Comolli R. Activation of protein kinase C- α isoform in murine melanoma cells with high metastatic potential. *Clin Exp Metastasis* 1997; 15: 568-579.
651. Haber DA, Buckler AJ, Glaser T, et al. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* 1990; 61: 1257-69.
652. Davies JA, Lodomery M, Hohenstein P, et al. Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the WT1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 235-46.
653. Little MH, Prosser J, Condie A, et al. Zinc finger point mutations within the WT1 gene in Wilms tumor patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4791-5.
654. Tadokoro K, Fujii H, Ohshima A, et al. Intragenic homozygous deletion of the WT1 gene in Wilms' tumor. *Oncogene* 1992; 7:1215-21.
655. Scharnhorst V, Van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* 2001; 273: 141-61.
656. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990; 346: 194-7.
657. Menke A, McInnes L, Hastie ND, Schedl A. The Wilms' tumor suppressor WT1: approaches to gene function. *Kidney Inter* 1998; 53: 1512-8.
658. Inoue K, Ogawa H, Yamagami T, et al. Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood* 1996; 88:2267-78.
659. Oji Y, Yamamoto H, Nomura M, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 712-7.
660. Silberstein GB, Van Horn K, Strickland P, et al. Altered expression of the WT1 Wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:8132-7.
661. Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer* 2002; 100: 297-303.
662. Amini Nik S, Hohenstein P, Jadidizadeh A, et al. Up-regulation of Wilms' tumor gene 1 (WT1) in desmoid tumours. *Int J Cancer* 2005; 114: 202-8.
663. Oji Y, Suzuki T, Nakano Y, Maruno M, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene 1 in primary astrocytic tumors. *Cancer Sci* 2004; 95: 822-7.
664. Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, et al. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 194-204.
665. Perry BN, Cohen C, Govindarajan B, Cotsonis G, Arbiser JL. Wilms' tumor 1 expression present in most melanomas but nearly absent in nevi. *Arch Dermatol* 2006; 142: 1031-4.
666. Wilsher M, Cheerale B. WT1 as a complementary marker of malignant melanoma: an immunohistochemical study of whole sections. *Histopathology* 2007; 51: 605- 10.
667. Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC complementation shows a requirement for WT1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 1999; 126: 1845-57.
668. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, gene WT1. *Hum Mol Genet* 2006; 15: R196-R201.
669. Algar EM, KhromykhT, Smith SI, Blackburn DM, Bryson GJ, Smith PJ. A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukemia cell lines. *Oncogene* 1996; 12: 1005-14.
670. Tsuboi A, Oka Y, Osaki T, et al. WT1 peptide-based immunotherapy for patients with lung cancer: report of two cases. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 175-84.
671. Wassmuth R. HLA/MHC class II gene regulation. In: Mc Michael AJ ed. *HLA and MHC: genes, molecules, function*. Oxford: BIOS Scientific Publisher, 1996; pp249-76.
-

672. Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; 411: 380-4.
673. Becker JC, Brabletz C, Czerny C, Termeer C, Brocker EB. Tumor escape mechanisms from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4+ human T cell clone by autologous MHC classII+ melanoma. *Int Immunol* 1993; 5: 1501.
674. Ehrlich P. über den Jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909; 5: 273- 290.
675. Salih HR, Nusser V. Commentary: immune escape versus tumor tolerance: how do tumors evade immune surveillance? *Eur J Med Res* 2001; 6: 323-32.
676. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from surveillance to tumor escape.. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-8.
677. Apple RJ, Erlich HA Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA-DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nat Genet* 1994; 6: 157- 162.
678. ChaudhuriS, Cariappa A, Tang M, Bell D, Harber DA, et al. Genetic susceptibility to breast cancer: HLA-DQB*03032 and HLA-DRB1*11 may represent protective alleles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11451-4.
679. Kübler K, Arndt PF, Wardelmann E, Krebs D, Kuhn W, van der Ven K. HLA-classII haplotype associations with ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006; 119: 2980- 2985.
680. Franzke A, Buer J, Probst-Keeper M, et al. HLA phenotype and cytokine-induced tumor control in advanced renal cell cancer. *Cancer Bioth & Radioph* 2001; 16: 401.
681. Ruiter DJ, Bergman W, Welvaart K, et al. Immunohistochemical análisis of malignant melanomas and nevocellular nevi with monoclonal antibodies to distinct monomorphic determinants of HLA antigens. *Cancer Res* 1984; 44: 3930- 3935.
682. Ruiter DJ, Mattijssen V, Broecker EB, Ferrone S. MHC antigens in human melanomas. *Semin Cancer Biol* 1991; 2: 35- 45.
683. Bröcker EB, Suter L, Srog C. HLA-DR antigen expression in Primary Melanomas of the skin. *J Invest Dermatol* 1984; 82: 244-247.
684. Ostmeier H, Fuchs B, Otto F, et al. Can immunohistochemical markers and mitotic rate improve prognostic precision in patients with primary melanoma? *Cancer* 1999; 85: 2391- 2399.
685. D'Alessandro G, Zardawi I, Grace J, McCarthy WH, Hersey P. Immunohistological evaluation of MHC class I and II antigen expression on nevi and melanoma: relation to biology of melanoma. *Pathology* 1987; 19: 339-346.
686. Wilson BS, Indiveri F, Pellegrino MA, Ferrone S. DR (Ia-like) antigens on human melanoma cells. Serological detection and immunochemical characterization. *J Exp Med* 1979; 149: 658- 668.
687. Elder DE, Rodeck U, Thurin J, Cardillo F, et al. Antigenic profile of tumor progression stages in human melanocytic nevi and melanomas. *Cancer Res* 1989; 49: 5091- 5096.
688. Rodriguez T, Mendez R, Del Campo A, et al. Patterns of constitutive and IFN- γ inducible expression of HLA class II molecules in human melanoma cell lines. *Immunogenet* 2007; 59: 123- 133.
689. Brady MS, Eckels DD, Ree SY, Lee JS. HLA classII antigen presentation by melanoma. *Hum Immunol* 1996; 47: 22.
690. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, et al. Induction of antigen-specific T cell anergy: an early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1178-1183.
691. Brady MS, Eckels DD, Lee F, Ree SY, Lee JS. Cytokine production by CD4+ T-cells responding to antigen presentation by melanoma cells. *Melanoma Res* 1999; 9 (2): 173- 180.
692. Lee JE, Abdalla J, Porter GA, Bradford L, et al. Presence of the human leukocyte antigen class II gene DRB1*1101 predicts interferon γ levels and disease recurrence in melanoma patients. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 587- 593.
693. Wittke F, Hoffman R, Buer J. Interleukine 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 79: 1182-4.
694. Tatour E, Dorval T, Mosseri V, et al. Serum interleukine 6 and C-reactive protein levels correlate with resistance to IL-2 therapy and poor survival in melanoma patients. *Br J Cancer* 1994; 69: 911-913.

-
695. Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, et al. Elevated plasma levels of interleukine-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 1995; 5: 67-8.
696. Porter GA, Abdalla J, Lu M, et al. Significance of plasma cytokine levels in melanoma patients with histologically negative sentinel lymph nodes. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 116-22.
697. Sondak VK, Chang AE. Melanoma and human leukocyte antigen status: the missing link? *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 723-724.
698. Champoux JJ. DNA Topoisomerases: structure, function and mechanism. *Ann Rev Biochem* 2001; 70: 369-412.
699. Salceda J, Fernández X, Roca J. Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA. *EMBO J* 2006; 25: 2575- 2583.
700. Turley H, Comley M, Houlbrook S, et al. The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerase II in normal and neoplastic human tissues. *Br J Cancer* 1997; 75: 1340.
701. Isaacs RJ, Harris AL, Hickson ID. Regulation of the human topoisomerase II alpha gene promoter in confluence-arrested cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 16741.
702. Sullivan GF, Amenta PS, Villanueva JD, Alvarez CJ, Yang JM, Hait WN. The expression of drug resistance gene products during the progression of human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1393.
703. Jarvinen TA, Holli K, Kuukasjarvi T, Isola JJ. Predictive value of topoisomerase II alpha and other prognostic factors for epirubicin chemotherapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 2267.
704. Lino K, Sasano H, Yabuki N, et al. DNA topoisomerase II alpha and Ki-67 in human adrenocortical neoplasms: a possible marker of differentiation between adenomas and carcinomas. *Mod Pathol* 1997; 10: 991.
705. Rudolph P, Kellner U, Chassevent A, et al. Prognostic relevance of a novel proliferation marker, Ki-S11, for soft tissue sarcoma. A multivariate study. *Am J Pathol* 1997; 150: 1997-2007.
706. Lohri A, Reuter J, Gudat F, Herrman R. Topoisomerase II alpha mRNA and tumour cell proliferation in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 1997; 50: 22.
707. Lynch BJ, Komaromy-Hiller G, Bronstein IB, Holden JA. Expresión of DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase II alpha and p-53 in metastatic malignant melanoma. *Hum Pathol* 1998; 29: 1240.
708. Rudolph P, Lappe T, Schubert C, et al. Diagnostic assessment of two novel proliferation specific antigens in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Pathol* 1995; 147: 1615.
709. Mu XC, Tran TA, Ross JS, Carlson JA. Topoisomerase II alpha expression in melanocytic nevi and malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 2000; 27: 242- 248.
710. Kern MA, Helmbach H, Artuc M, et al. Human melanoma cell lines selected in vitro displaying various levels of drug resistance against cisplatin, fotemustine, vindesine or etoposide: modulation of protooncogene expression. *Anticancer Res* 1997; 17: 4359.
711. Cole SP, Deeley RG. Multidrug resistance associated with overexpression of MRP. *Cancer Treat Res* 1996; 87: 39.
712. Schadendorf D, Czarnecki BM. Drug resistance of malignant melanoma. Mechanisms and possible modulation. *Hautarzt* 1994; 45: 678.
713. Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 351- 375.
714. Schneider L, Hsiang YH, Liu LF. DNA topoisomerases as anticancer drug targets. *Adv Pharmacol* 1989; 58: 149.
715. Robinson MJ, Osheroff N. Effects of antineoplastic drugs on the post-strand-passage DNA cleavage/relegation equilibrium of topoisomerase II. *Biochemistry* 1991; 30: 1807.
716. Kirschner LS, Greenberger LM, Hsu SI, Yang CP, et al. Biochemical and genetic characterization of the multidrug resistance phenotype in murine macrophage-like J774.2 cells. *Biochem Pharmacol* 1992; 43 (1): 77- 87.
717. Lage H, Helmbach H, Dintel M, Schadendorf D. Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *Br J Cancer* 2000; 82: 488-491.
718. Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 351- 375.
719. Campain JA, Gottesman MM, Pastan I. A novel mutant topoisomerase IIalpha present in VP-16-resistant human
-

melanoma cell lines has a deletion of alanine 429. *Biochemistry* 1994; 33: 11327.